



ISSN 1726-9784



# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal  
of Biotherapy

3/2013

ISSN 1726-9784

# РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№3 Том 12 2013 г.

УДК 616-085.2/.3

## Учредители

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

## Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

## Заместители главного редактора

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

## Редколлегия

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

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

## Почтовый адрес:

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

## Подписной индекс 81679

Объем 6 усл.-печ. листов,  
подписано в печать 21.10.2013  
Тираж 1000 экз.

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

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

## СОДЕРЖАНИЕ

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

|   |    |
|---|----|
| <i>В.Н. Кондратова, И.В. Ботезату, В.П. Шелепов, А.В. Лихтенштейн</i><br><b>ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА</b> .....  | 3  |
| <i>К.И. Бражник, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, И.Р. Набиев, А.В. Суханова</i><br><b>НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ И РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА<br/>С ПРИМЕНЕНИЕМ ДЕТЕКЦИОННЫХ СИСТЕМ<br/>НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ</b> ..... | 11 |
| <i>М.И. Комаров, И.В. Поддубная</i><br><b>ДВУХСТОРОННИЙ РАК ПОЧЕК ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ</b> .....   | 25 |

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|   |        |
|---|--------|
| <i>С.С. Шушанов, Т.А. Кравцова, Ю.Б. Черных</i><br><b>ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 ТИП (IGF-1)<br/>НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА</b> .....   | 29     |
| <i>Соколова Т.М., Кособокова Е.Н., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Косоруков В.С., Ершов Ф.И.</i><br><b>АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА<br/>В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА НТС116:<br/>РЕГУЛЯЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ИНТЕРФЕРОНАМИ АЛЬФА2<br/>ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ</b> ..... | 39     |
| <i>Г.А. Меерович, С.Ш. Каршиева, И.Г. Меерович, М.С. Белов, А. В. Фабер, В.Б. Лощенов, Е.А. Лукьянец</i><br><b>ПОВЫШЕНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОСЕНСА<br/>ПРИ СОВМЕСТНОМ ВВЕДЕНИИ С ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОМ</b> .....   | 45     |
| <i>О.А. Бочарова, Р.В. Карпова, В.А. Ильенко, Е.В. Бочаров, И.В. Казеев</i><br><b>ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНТЕГРИНЫ<br/>ПРИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ВЫСОКОРАКОВЫХ МЫШЕЙ СВА</b> .....   | 53     |
| <i>А.Н. Балаев, В. Н. Осипов, В.Е. Федоров, Л.И. Смирнова, А.П. Смирнова, Л.П. Сушинина,<br/>С.В. Устинкина, З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева</i><br><b>ЭФФЕКТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ АГОНИСТОВ СОМАТОСТАТИНА<br/>НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ</b> .....                                   | 57     |
| <i>Д.К. Кенбаева</i><br><b>КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ:<br/>СРАВНЕНИЕ ВАРИАНТОВ ИММУНОТЕРАПИИ</b> .....  | 61     |
| <i>А.П. Безуглый, А.Н. Хлебникова, Е.В. Селезнева, Н.Н. Бикбулатова, П.А. Белков, Г.Э. Баграмова</i><br><b>УЛЬТРАСОНОГРАФИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АКТИНИЧЕСКОГО КЕРАТОЗА</b> .....  | 65     |
| <b>Материалы Белорусско-Российской научно-практической конференции<br/>с международным участием «ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ»,<br/>Минск, 23–25 мая 2013 года</b> .....   | 51; 60 |

|  |    |
|--|----|
| <b>К 100-летию со дня рождения В.В. Киселёва</b> ..... | 70 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Правила оформления статей</b> ..... | 72 |
|--|----|

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006.04-07:577.113

*В.Н. Кондратова, И.В. Ботезату, В.П. Шелепов, А.В. Лихтенштейн***ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА***ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация:***Анатолий Владимирович Лихтенштейн, заведующий лабораторией биохимии опухолей НИИ канцерогенеза***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(499)324-17-79**e-mail:** [alicht@crc.umos.ru](mailto:alicht@crc.umos.ru)

Статья поступила 18.03.2013; принята к печати 09.07.2013.

**Резюме**

Присутствие в крови и других биологических жидкостях организма нуклеиновых кислот (ДНК, мРНК, микроРНК) обусловлено как распадом клеток (апоптозом, некрозом), так и продукцией ими специфических, содержащих нуклеиновые кислоты, органелл (экзосом, микровезикул, апоптотических пузырьков). Гуморальная среда служит средством утилизации клеточных отходов в первом случае, межклеточной кооперации – во втором. Циркулирующие в кровотоке нуклеиновые кислоты, происходящие из раковых клеток, могут служить маркерами опухолевого роста. В обзоре представлены данные о диагностическом потенциале циркулирующих нуклеиновых кислот, о достижениях и проблемах этого направления исследований.

**Ключевые слова:** диагностика опухолей, плазма крови, ДНК, мРНК, микроРНК.*V.N. Kondratova, I.V. Botezatu, V.P. Shelepov, A.V. Lichtenstein***CELL-FREE NUCLEIC ACIDS AS MARKERS OF TUMOR GROWTH***FBSI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

The presence in blood and other body fluids of nucleic acids (DNA, mRNA, miRNA) is due to both cell death (apoptosis, necrosis) and cell production of specific nucleic acid-containing organelles (exosomes, shedding microvesicles, apoptotic blebs). Humoral medium serves as a means of waste disposal, in the first case, and a means of cell communication, in the second. Circulating nucleic acids derived from cancer cells may serve as markers of tumor growth. Diagnostic potential of circulating nucleic acids, the achievements, and problems of this field of research are considered.

**Key words:** cancer diagnostics, blood plasma, DNA, mRNA, microRNA.**Введение**

В серологии, предметом которой до последнего времени были почти исключительно иммунологические реакции между антигенами и антителами, появилась новая глава: циркулирующие в крови внеклеточные (свободные) нуклеиновые кислоты (ДНК, мРНК, микроРНК). Новые методические возможности (в частности, высокопроизводительное полногеномное секвенирование) значительно расширили и во многом изменили наши представления о природе, возможных функциях и диагностическом потенциале этих молекул. Если еще недавно их рассматривали исключительно как следствия клеточного распада, в последнее время приходит понимание того, что некоторая часть циркулирующих нуклеиновых кислот участвует в особом виде гуморальной регуляции (горизонтальном переносе генетической информации). В свободном состоянии или, скорее, в составе специализированных органелл (экзосом) они играют важную роль в межклеточной кооперации, а в организме онкологического больного – во взаимодействии и взаимовлиянии опухолевых и нормальных клеток [38; 66].

Поскольку в кровотоке собирается ДНК и РНК всех тканей организма (они постоянно обновляются, вследствие чего ежедневно в организме

взрослого человека распадается  $\sim 10^{11}$  клеток [75]), появляется принципиальная возможность обнаружения в крови чужеродных (отличающихся от клеток “дикого” типа) генетических элементов: вирусных ДНК [77; 78], ДНК клеток плода (в кровотоке беременной женщины) [81], ДНК и РНК злокачественно трансформированных клеток [109].

Последний аспект наиболее важен. Тестирование плазмы (или сыворотки) крови онкологических больных на предмет присутствия в ней «опухолевых» нуклеиновых кислот служит нескольким целям.

Во-первых, такая «жидкостная биопсия» (*liquid biopsy* [33]) крайне желательна в тех нередких, особенно на ранней стадии процесса, случаях, когда присутствующий в опухоли и ответственный за ее лекарственную устойчивость клон количественно незначителен [33; 86].

Во-вторых, обычная биопсия, позволяющая получить одиночные фрагменты, зачастую не дает полного представления о клональной гетерогенности и мутационном «профиле» всей опухоли [48].

В-третьих, «жидкостная биопсия», будучи малоинвазивным подходом, может выполняться многократно, до и после удаления опухолевого очага, что позволяет следить за ходом заболевания и оценивать эффективность лечения. Преимущество ДНК-маркеров (в сравнении с давно известными

маркерами-белками) – онкоспецифичность (т.е. непосредственная, причинно-следственная, а не косвенная связь с канцерогенезом) и универсальность (нет опухолевой клетки без того или иного генетического или эпигенетического дефекта). К числу не преодоленных пока проблем этого нового подхода можно отнести множественность маркеров, отсутствие (у некоторых из них) тканевой специфичности, недостаточная стандартизация методов.

В данном обзоре рассматриваются диагностические аспекты анализа циркулирующих нуклеиновых кислот: его возможности, перспективы и существующие проблемы.

#### **Циркулирующие нуклеиновые кислоты: происхождение**

Циркулирующие в кровотоке ДНК, обнаруженные свыше 60 лет назад [83], стали в последнее время объектом внимания экспериментаторов и клиницистов в качестве перспективных опухолевых маркеров [103]. Известно, что в крови человека содержится свободных (внеклеточных) нуклеиновых кислот при некоторых патологических процессах (онкологическое заболевание, воспаление, травма и т.п.) повышено. Так, в крови онкологических больных обнаружены происходящие из опухолевых клеток фрагменты ДНК с характерными абберациями (мутантный *K-RAS*, измененные микросателлитные последовательности, метилированные CpG-островки в промоторах генов-супрессоров) [4; 21; 39; 90; 112; 135], а также «опухолевые» мРНК [46; 88] и микроРНК [72; 87].

Присутствие в крови здоровых лиц и онкологических больных циркулирующих ДНК и РНК (цДНК и цРНК) обусловлено, по-видимому, двумя процессами: клеточным распадом (апоптозом и некрозом) и клеточной секрецией [45; 115]. Апоптоз и некроз (последний характерен для опухолевой ткани из-за присущей ей гипоксии) ведут к высвобождению клеточного содержимого, фрагментации молекул и их фагоцитозу [26; 60]. Циркулирующие в кровотоке опухолевые клетки также могут вносить вклад в пул внеклеточных молекул [101; 102]. Несмотря на высокую эффективность фагоцитоза, часть нуклеиновых кислот, не включенных в апоптотические тельца, оказывается в кровотоке [75]. В зависимости от механизма клеточной гибели и молекулярной структуры, они в разной степени подвержены воздействию агрессивной по отношению к ним (богатой нуклеазами) внеклеточной среды: двунитевые и находящиеся в комплексе с нуклеосомами ДНК защищены лучше, чем однонитевые мРНК, а наиболее устойчивы микроРНК – в силу своих малых (22–24 оснований) размеров. Отмечена имеющая практическое значение закономерность: нормальные клетки претерпевают, как правило, упорядоченный процесс апоптоза с образованием и поступлением в кровоток дискретных фрагментов преимущественно мононуклеосомного размера (~150 пар оснований), тогда как для опухолевых клеток более характерен некроз (образующиеся при этом ДНК гетерогенны и имеют размер в интервале 200–400 пар оснований) [26; 60; 62; 115]. В зависимости от стадии процесса и, соответственно, от размера опухоли доля «опухолевых» ДНК варьирует в широких пределах (от 3 до 93 % общей массы цДНК) [61]. Уровень ДНК определяется динамическим равновесием противоположных процессов: ее поступления в кровоток (в результате клеточного распада и секреции) и выведения из него (из-за гидролиза нуклеазами, поглощения

клетками печени, экскреции почками). Клиренс цДНК весьма эффективен [10]: время ее полужизни в крови составляет ~15 мин, хотя в некоторых случаях, при снижении функциональных способностей организма, может составлять несколько часов [44].

Циркулирующие нуклеиновые кислоты могут существовать, по-видимому, в свободном состоянии или в ассоциации с клеточной поверхностью (эти альтернативные формы характерны, соответственно, для опухолевых и нормальных клеток [22; 71; 98; 111], что представляет большой интерес как с фундаментальной, так и практической точек зрения). Вероятно, определенную роль в утилизации продуктов клеточного распада играет белок плазмы крови SAP, который связывается с хроматином, солюбилизирует его (вытесняя гистон H1) и предохраняет от действия ДНКаз. SAP связывается с апоптотическими тельцами и с продуктами некротического клеточного распада [7]. Фракционирование ДНК и РНК плазмы крови методами центрифугирования и фильтрации выявляет «нефильтруемую» фракцию, ассоциированную, видимо, с крупными структурами [25; 92]. В составе последних (ими являются, вероятно всего, апоптотические тельца и/или экзосомы) внеклеточные ДНК и РНК могут участвовать в «горизонтальном» переносе генетической информации и межклеточной кооперации [38; 55; 56; 58; 66; 96; 122].

#### **Циркулирующие нуклеиновые кислоты: маркеры опухолевого роста**

Движущей силой канцерогенеза является накопление в соматических клетках дефектов протоонкогенов, супрессоров и ряда других функционально значимых генов [36; 50]. Наиболее часто обнаруживаемые мутации (*driver mutations*), определяющие канцерогенез, подвергаются углубленному (верифицирующему) экспериментальному анализу и становятся, в ряде случаев, объектом клинических тестов. В отличие от широкомасштабных экспериментов полногеномного секвенирования, направленных на выявление всех присутствующих в опухоли мутаций (их тысячи), верифицирующие и диагностические исследования имеют дело с ограниченным набором уже отобранных на первом этапе наиболее значимых «мишеней» (последние рассматривают как возможные опухолевые маркеры). Действительно, обнаружение специфически измененных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях организма (кровь, лимфа, естественные выделения) может сигнализировать о появлении опухоли. При этом значимость генетического дефекта как маркера опухолевого роста определяется такими факторами, как степень ассоциации с онкологической патологией (насколько часто встречается при разных опухолях), простота и надежность выявления.

Соответственно генетическим и эпигенетическим нарушениям, лежащим в основе канцерогенеза, обнаруживаемые в крови маркеры подразделяют на несколько типов:

- а) мутации онкогенов и генов-супрессоров (кластерные, сосредоточенные в пределах 1–3 кодонов, как в случае онкогена *RAS*, или рассеянные по длине гена, как в случае генов-супрессоров *TP53* и *APC*);
- б) феномен потери гетерозиготности (LOH, loss of heterozygosity – исчезновение одной аллели какого-либо гетерозиготного локуса), что обычно служит указанием на делецию гена-супрессора;

- в) аберрантное метилирование так называемых CpG-островков в промоторах генов-супрессоров.

Кроме того, показателями онкологической патологии могут служить:

- а) увеличение концентрации и степени полимерности цДНК;  
 б) появление в крови специфических вирусных последовательностей;  
 в) накопление специфических мРНК и микроРНК.

#### Концентрация ДНК

Есть свидетельства диагностической значимости повышенного уровня цДНК, который, возможно, отражает растущую массу опухоли [65; 89; 113; 124]. Это, возможно, является следствием пониженной у онкологических больных ДНКазной активности плазмы крови [23; 24; 125]. Показано, что интервал значений цДНК в крови онкологических больных составляет 0–1000 нг/мл (в среднем 180 нг/мл) [3; 105; 120], тогда как у здоровых лиц этот показатель значительно ниже (0–100 нг/мл, в среднем – 30 нг/мл) [44]. Отмечено также снижение уровня цДНК в крови больного после удаления опухолевого очага [15]. Хотя связь повышенного уровня ДНК с онкологическим процессом была обнаружена и в ряде других работ [64; 133], большая вариабельность этого показателя внутри каждой из исследованных групп, и, кроме того, значительное межгрупповое перекрытие интервалов значений, снижают до некоторой степени его диагностическую значимость. С учетом этих обстоятельств кажется оправданным оценивать уровень цДНК как вспомогательный показатель и использовать его в комплексе с другими маркерами.

#### Степень полимерности ДНК

Результаты, опубликованные в 2012 г. консорциумом ENCODE, существенно изменили наши представления о структуре генома человека и о функции не кодирующих белки последовательностей [126]. Последние в значительной степени состоят из многократно повторяющихся транспозонов и ретротранспозонов [42]. Множественность семейства *ALU* (в геноме человека присутствуют сотни тысяч копий этого транспозона, принадлежащего к классу SINE) делает эти последовательности удобным объектом генетического анализа, поскольку многократно повышает шансы их обнаружения в биологических жидкостях организма.

Как отмечено выше, нормальные клетки распадаются обычно с образованием дискретных мононуклеосомных фрагментов, тогда как для распада некротизированных опухолевых масс более характерны крупные и гетерогенные фрагменты [26; 60; 62; 115]. Возможность дискриминировать таким относительно простым способом (по размеру) фрагменты ДНК, происходящие из нормальных и опухолевых клеток, была использована с целью диагностики [131; 132]. Методом количественного ПЦР в реальном времени оценивали соотношение ампликонов разного размера (247 и 115 пар оснований), синтезированных на матрице циркулирующих в крови последовательностей *ALU* (многокопийность последних обеспечивает высокую чувствительность теста). Действительно, степень полимерности циркулирующей ДНК (о которой судили по соотношению масс ампликонов) у онкологических больных оказалась достоверно выше, чем у здоровых доноров [17; 40; 99; 131; 132]. Этот показатель оказался полезным средством мониторинга патологического процесса.

#### Потеря гетерозиготности (ЛОН)

Возможность обнаружения этого феномена, заключающегося в исчезновении в «опухолевой» ДНК одной из двух аллелей гетерозиготного локуса, кажется *a priori* невероятной в условиях избытка цДНК дикого типа (обладающей обеими аллелями). Тем не менее, ЛОН во многих случаях выявлена [9; 11; 101; 104; 110; 114; 119; 123], что свидетельствует об ощутимой доле «опухолевой» фракции в тотальной цДНК. Подтверждающие это предположение данные получены при ее («опухолевой» ДНК) определении по степени метилирования промотора гена-супрессора *CDKN2A* (этот эпигенетический показатель специфичен для раковых клеток; см. ниже). Оказалось, что доля «опухолевой» цДНК в тотальной цДНК варьирует в широких пределах (от 3 до 93 %) [60]. Расхождения в результатах, полученных разными исследователями (ЛОН иногда не удается выявить) [44], обусловлены, видимо, рядом технических трудностей: относительно низкой концентрацией цДНК в плазме крови, ее фрагментацией, значительным иногда избытком ДНК дикого типа [30; 34; 53; 70].

#### Мутации опухоль-специфических генов

«Драйвер»-мутации, наиболее часто обнаруживаемые во многих опухолях, затрагивают относительно небольшое число функционально важных генов: *K-RAS*, *TP53*, *APC*, *BRAF*, *EGFR*, *PTEN*, *RB*, *MYC*. Эти дефекты могут быть ограничено специфичны для опухоли определенного типа (например, *APC* – для рака толстой кишки [34], *K-RAS* – для опухолей толстой кишки и поджелудочной железы [47; 129], *BRAF* – для меланомы [107], *EGFR* – для рака легких [68]). Их тестирование в составе цДНК используют для раннего выявления опухолевого очага, мониторинга уже возникшей опухоли, оценки эффективности лечения [32]. Анализ цДНК крови (жидкостная биопсия) – малоинвазивная процедура, обеспечивающая мониторинг процесса в условиях, когда обычная биопсия невозможна (например, после удаления опухоли) [103].

Реализацию этих возможностей в ряде случаев затрудняет, помимо известных проблем (низкая концентрация мутантных последовательностей, избыток аллелей дикого типа, фрагментация ДНК), множественность мутаций: так, в противоположность онкогену *K-RAS*, мутации которого сконцентрированы на небольшом пространстве (чаще всего кодоны 12–13), у гена-супрессора *TP53* – десятки функционально значимых мутаций, рассеянных на пространстве нескольких экзонов. Это обстоятельство усложняет анализ и требует применения методов массового параллельного секвенирования [84].

#### Аберрантное метилирование

Метилирование ДНК приводит к стабильному подавлению транскрипции (*silencing*) соответствующего локуса [41]. В норме оно затрагивает, в основном, повторяющиеся последовательности: многие повторы, накапливавшиеся в геноме человека на протяжении эволюции, по-видимому, функционально бесполезны, другие (транспозоны и ретротранспозоны) – потенциально опасны. Основной мишенью метилирования ДНК является динуклеотид CpG, распределение которого в геноме человека может быть рассеянным (~80 % общего числа) или кластерным в виде так называемых «CpG-островков» (~20 %). Последние локализованы преимущественно в промоторах структурных генов [100].

Опухолевые клетки характеризуются крупномасштабными изменениями системы метилирования ДНК: общим деметилированием генома и локаль-

ным его гиперметилированием (первое затрагивает, в основном, «рассеянные» CpG, тогда как последнее – CpG-островки [6; 74]). Локальное гиперметилирование промотора инактивирует прилежащий ген: стерическое препятствие, создаваемое метильной группой цитозина и связывающимися с ним белками, исключает возможность ассоциации транскрипционных факторов [51]. Аберрантное метилирование гена-супрессора («эпимутация») фенотипически равносильна его мутации [63].

Имеется множество свидетельств определяющей роли аберрантного метилирования ДНК в возникновении и прогрессии опухолей человека. Гены-супрессоры *p16<sup>ink4a</sup>* [121; 127; 128], *p15<sup>ink4b</sup>*, *HIC* (hypermethylated in cancer), *WAF*, *VHL*, *E-cad* [6], *Rb1* (и родственные ему гены) [35], *hMLH1* [52] инактивированы во многих опухолях именно таким образом.

Для анализа метилирования последовательностей ДНК обычно используют пары рестрикционных эндонуклеаз (чувствительных и не чувствительных к метилированию цитозина): например, *HpaII* и *MspI*; *TaqI* и *Sau 3A*; *SmaI* и *XmaI*. Широкое применение нашел также метод бисульфитной обработки ДНК, приводящий к дезаминированию цитозина с образованием урацила (метилированные остатки цитозина остаются интактными). Этот прием позволяет либо подобрать праймеры, избирательно амплифицирующие специфические метилированные CpG-островки, либо посредством полногеномного секвенирования определить «паттерн» метилирования *in toto* [8].

Аберрантно метилированные промоторы генов-супрессоров – наиболее частый и диагностически значимый объект при анализе цДНК. Их постоянно находят и используют для мониторинга роста опухоли у больных наиболее распространенными формами онкологических заболеваний (опухоль простаты, толстой кишки, яичников, легких, яичников, поджелудочной железы) [103].

#### Вирусные последовательности

Значительная часть (15–20 %) онкологических заболеваний имеет вирусную этиологию: вирусы папилломы и гепатита В человека (HPV и HBV, соответственно) вносят значительный вклад в заболеваемость раком шейки матки и печени. Присутствие специфических вирусных последовательностей в составе циркулирующих ДНК может служить важным диагностическим показателем. Так, нарастание числа копий ДНК HBV в крови после хирургического удаления опухоли печени свидетельствует с высокой вероятностью о рецидиве заболевания [67].

Рак носоглотки – одна из наиболее распространенных форм злокачественных новообразований, ассоциированных с вирусной инфекцией [54]. Этиологическим фактором является вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), эндемичным районом – Китай, Тайвань, Гонконг [43]. В крови больных раком носоглотки методом ПЦР постоянно находят последовательности вирусной ДНК, что позволяет создать на этой основе надежный скрининг-тест [17; 73; 77; 78; 80]; динамика изменений числа копий вирусной ДНК позволяет вести мониторинг заболевания и оценить эффективность лечения [79; 108]. В эндемичном районе (Россия) отмечены некоторые особенности динамики изменений числа копий вирусной ДНК у больных опухолями головы и шеи [37].

#### Циркулирующие мРНК

Учитывая чрезвычайную чувствительность одноклеточных нуклеиновых кислот к нуклеазам,

трудно было рассчитывать на возможность их выявления в обладающих высокой нуклеазной активностью биологических жидкостях организма [94; 134]. Тем не менее, в плазме и сыворотке крови онкологических больных обнаруживают мРНК различных генов, что согласуется с представлением об их включении в некие защитные комплексы (предположительно, экзосомы) [27; 95].

Как и при исследовании ДНК, были приняты попытки оценить степень полимерности циркулирующих мРНК. При этом исходили из того факта, что в плазме крови онкологических больных активность РНКаз значительно повышена. Действительно, определение методом ПЦР в реальном времени соотношения числа копий концевых и начальных участков модельной мРНК (гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) обнаружило существенное (и коррелирующее со стадией заболевания) снижение этого показателя у больных раком носоглотки [134].

Для выявления циркулирующих мРНК используют обычно гибридизацию с последовательностями микрочипов или количественную ОТ-ПЦР [93]. Таким способом показана высокая диагностическая значимость уровня мРНК hTERT (обратной транскриптазы теломеразы) и EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) в сыворотке крови больных раком легких [88]. Присутствие в плазме крови мРНК циклина D1 и тимидилатсинтазы оказалось неблагоприятным прогностическим признаком нечувствительности к гормонотерапии у больных раком молочной железы [46].

Хотя присутствие специфических мРНК в крови онкологических больных может иметь большое диагностическое и прогностическое значение, очевидно также, что этот подход требует дальнейшей верификации на больших контингентах больных.

#### Циркулирующие микроРНК

Открытие механизма регуляции внутриклеточных процессов посредством микроРНК, отмеченное Нобелевской премией 2006 г., – одно из главных событий молекулярной биологии последних лет [49]. Зрелые микроРНК (22–24 нуклеотида) являются продуктом сложного процессинга РНК-предшественников, синтезирующихся на ядерных генах (в клетках человека их число в пределах 1000). Несомненно важная роль этих молекул в канцерогенезе: в пролиферации клеток, апоптозе, эпителиально-мезенхимальном переходе, взаимодействии опухоли и микроокружения, метастазировании [1; 5; 13; 31; 130].

Эти факты предопределяют большой интерес к исследованию циркулирующих микроРНК. С методической точки зрения их анализ сопряжен с рядом особенностей: с одной стороны, они оказались чрезвычайно стабильными (в значительной степени благодаря малым размерам), но, с другой стороны, по той же причине – крайне неудобными для амплификации. Последнее обстоятельство обусловило необходимость разработать особый дизайн праймеров для ОТ-ПЦР [19]. Кроме того, оказалась весьма трудной проблема нахождения адекватных внутренних контролей для нормализации получаемых количественных результатов [103].

Тем не менее, за короткое время, прошедшее с момента обнаружения повышенного уровня микроРНК в крови больного лимфомой в 2008 г. [72], исследование их «профиля» у онкологических больных стало одним из наиболее перспективных направлений молекулярной диагностики рака [20; 28; 29; 85; 87; 130]. Так, оказалось, что уровень

циркулирующей miR-34a у больных раком молочной железы повышается по мере развития первичной опухоли и при возникновении метастазов [97]; характерное сочетание («сигнатура») четырех микроРНК (miR-486, miR-30d, miR-1 и miR-499) может служить надежным прогностическим показателем у больных немелкоклеточным раком легких [57]; уровень miR-92 позволяет дифференцировать опухоли толстой кишки и желудка [91]. Учитывая быстрый прогресс в этой области, можно прогнозировать расширение этих исследований и внедрение их результатов в клиническую практику.

#### Трансренальные ДНК

Существование «трансрентальной» (т.е., преодолевшей почечный барьер) ДНК, способной быть объектом генетического анализа, впервые показано в 2000 г. [10]. Позднее в составе цДНК, выделенной из мочи беременных женщин, были обнаружены также короткие фрагменты ДНК плода, т.е., преодолевшие в дополнение к почечному еще и плацентарный барьер [2; 59; 69; 76; 82; 106; 116]. При исследовании трансрентальных фрагментов больных легочным туберкулезом выявлены фрагменты ДНК туберкулезной палочки [14], больных раком носоглотки – вирусная ДНК ВЭБ [18], больных опухолями поджелудочной железы и толстой кишки – происходящие из опухолевых клеток мутантные

последовательности K-RAS [16; 76; 116–118]. Тем самым продемонстрирована принципиальная пригодность данного способа (неинвазивного и не ограниченного количеством исходного клинического материала) для пренатальной диагностики плода, выявления присутствующих в организме инфекционных агентов и опухолевых клеток.

#### **Выводы**

Генодиагностика рака, основанная на анализе циркулирующих в биологических жидкостях нуклеиновых кислот и использующая последние достижения фундаментальной онкологии, находится на пороге широкого внедрения в клиническую практику. На современном этапе ее развития становится необходимой стандартизация всех этапов сложной «технологической цепи»: условий получения и хранения биологического материала; методов выделения и количественной оценки полученных образцов (ДНК, РНК, микроРНК); условий применения аналитических процедур: секвенирования, микрочипов, ПЦР, плавления ДНК.

Необходим свод правил, подобных тем, что были установлены ранее в отношении количественной ОТ-ПЦР [12].

#### **Литература**

1. *Рязанский С.С., Гвоздев В.А.* Короткие РНК и канцерогенез // Биохимия – 2008. – 73. – P. 640–55.
2. *Al Yatama M.K., Mustafa A.S., Ali S. et al.* Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction // Prenat. Diagn. – 2001. – 21. – P. 399–402.
3. *Allen D., Butt A., Cahill D. et al.* Role of cell-free plasma DNA as a diagnostic marker for prostate cancer // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2004. – 1022. – P. 76–80.
4. *An Q., Liu Y., Gao Y. et al.* Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients // Cancer Lett. – 2002. – 188. – P. 109–14.
5. *Bartel D.P.* MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // Cell – 2009. – 136. – P. 215–33.
6. *Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R. et al.* Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia // Adv. Cancer Res – 1998. – 72. – P. 141–96.
7. *Bickerstaff M.C., Botto M., Hutchinson W.L. et al.* Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity // Nat Med – 1999. – 5. – P. 694–7.
8. *Bock C.* Analysing and interpreting DNA methylation data // Nat Rev Genet – 2012. – 13. – P. 705–19.
9. *Boddy J.L., Gal S., Malone P.R. et al.* Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease // Clin. Cancer Res. – 2005. – 11. – P. 1394–9.
10. *Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G. et al.* Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism // Clin. Chem. – 2000. – 46. – P. 1078–84.
11. *Bruhn N., Beinert T., Oehm C. et al.* Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2000. – 906. – P. 72–82.
12. *Bustin S.A., Benes V., Garson J.A. et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // Clin. Chem. – 2009. – 55. – P. 611–22.
13. *Calin G.A., Croce C.M.* MicroRNA signatures in human cancers // Nat Rev Cancer – 2006. – 6. – P. 857–66.
14. *Cannas A., Goletti D., Girardi E. et al.* Mycobacterium tuberculosis DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2008. – 12. – P. 146–51.
15. *Catarino R., Ferreira M.M., Rodrigues H. et al.* Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer // DNA Cell Biol. – 2008. – 27. – P. 415–21.
16. *Chan A.K., Chiu R.W., Lo Y.M.* Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis // Ann. Clin. Biochem. – 2003. – 40. – P. 122–30.
17. *Chan K.C., Leung S.F., Yeung S.W. et al.* Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients // Clin. Cancer Res. – 2008. – 14. – P. 4141–5.
18. *Chan K.C., Leung S.F., Yeung S.W. et al.* Quantitative Analysis of the Transrenal Excretion of Circulating EBV DNA in Nasopharyngeal Carcinoma Patients // Clin Cancer Res – 2008. – Vol. 14. – P. 4809–4813.
19. *Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J. et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucleic Acids Res – 2005. – 33. – P. e179.
20. *Chen X., Ba Y., Ma L. et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // Cell Res – 2008. – 18. – P. 997–1006.
21. *Chen X.Q., Stroun M., Magnenat J.L. et al.* Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients // Nat. Med. – 1996. – 2. – P. 1033–5.
22. *Cherepanova A.V., Bushuev A.V., Duzhak T.G. et al.* Ku protein as the main cellular target of cell-surface-bound circulating DNA // Expert. Opin. Biol. Ther. – 2012. – 12(Suppl 1). – P. S35–S41.
23. *Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E. et al.* Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of



- patients with prostate tumors // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 218–21.
24. Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Vlasov V.V., Laktionov P.P. Blood deoxyribonuclease activity in health and diseases // *Biomed. Khim.* – 2007. – 53. – P. 488–96.
  25. Chiu R.W., Poon L.L., Lau T.K. et al. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma // *Clin. Chem.* – 2001. – 47. – P. 1607–13.
  26. Choi J.J., Reich C.F., III, Pisetsky D.S. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells // *Immunology* – 2005. – 115. – P. 55–62.
  27. Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more // *Trends Cell Biol.* – 2009. – 19. – P. 43–51.
  28. Cortez M.A., Bueso-Ramos C., Ferdin J. et al. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2011. – 8. – P. 467–77.
  29. Cortez M.A., Calin G.A. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2009. – 9. – P. 703–11.
  30. Coulet F., Blons H., Cabelguenne A. et al. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P. 707–11.
  31. Croce C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – 10. – P. 704–14.
  32. De Roock W., Biesmans B., De Schutter J., Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer // *Mol. Diagn. Ther.* – 2009. – 13. – P. 103–14.
  33. Diaz Jr L.A., Williams R.T., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers // *Nature* – 2012. – 486. – P. 537–40.
  34. Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 2005. – 102. – P. 16368–73.
  35. Du Y., Carling T., Fang W. et al. Hypermethylation in human cancers of the RIZ1 tumor suppressor gene, a member of a histone/protein methyltransferase superfamily // *Cancer Res.* – 2001. – 61. – P. 8094–9.
  36. Eifert C., Powers R.S. From cancer genomes to oncogenic drivers, tumour dependencies and therapeutic targets // *Nat Rev Cancer* – 2012. – 12. – P. 572–8.
  37. Кондратова В.Н., Пирогова Н.А., Степина В.Н. и др. Маркеры вируса Эпштейна-Барр при раке носоглотки // *ВЕСТНИК РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* – 2012. – Т. 23. – С. 33–9.
  38. Eldh M., Ekstrom K., Valadi H. et al. Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA // *PLoS ONE* – 2010. – 5. – P. e15353.
  39. Ellinger J., Haan K., Heukamp L.C. et al. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer // *Prostate* – 2008. – 68. – P. 42–9.
  40. Ellinger J., Wittkamp V., Albers P. et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer // *J. Urol.* – 2009. – 181. – P. 363–71.
  41. Esteller M., Herman J.G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours // *J. Pathol.* – 2002. – 196. – P. 1–7.
  42. Fedoroff N.V. Transposable Elements, Epigenetics, and Genome Evolution // *Science* – 2012. – 338. – P. 758–67.
  43. Feng B.J., Huang W., Shugart Y.Y. et al. Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4 // *Nat Genet* – 2002. – 31. – P. 395–9.
  44. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey // *Biochim. Biophys. Acta* – 2007. – 1775. – P. 181–232.
  45. Gahan P.B., Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 1–6.
  46. Garcia V., Garcia J.M., Pena C. et al. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome // *Cancer Lett.* – 2008. – 263. – P. 312–20.
  47. Gautschi O., Huegli B., Ziegler A. et al. Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients // *Cancer Lett.* – 2007. – 254. – P. 265–73.
  48. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing // *N. Engl. J. Med* – 2012. – 366. – P. 883–92.
  49. Ghildiyal M., Zamore P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe // *Nat Rev Genet* – 2009. – 10. – P. 94–108.
  50. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer // *Nature* – 2012. – 481. – P. 306–13.
  51. Hendrich B., Tweedie S. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals // *Trends Genet.* – 2003. – 19. – P. 269–77.
  52. Herman J.G., Umar A., Polyak K. et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 1998. – 95. – P. 6870–5.
  53. Hibi K., Robinson C.R., Booker S. et al. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients // *Cancer Res.* – 1998. – 58. – P. 1405–7.
  54. Hildesheim A., Levine P.H. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review // *Epidemiol. Rev* – 1993. – 15. – P. 466–85.
  55. Holcik M. Deadly revenge: uptake of oncogenes from apoptotic bodies // *Trends Genet.* – 2001. – 17. – P. 491.
  56. Holmgren L., Szeles A., Rajnavolgyi E. et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies // *Blood* – 1999. – 93. – P. 3956–63.
  57. Hu Z., Chen X., Zhao Y. et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – 28. – P. 1721–6.
  58. Huan J., Hornick N.I., Shurtleff M.J. et al. RNA Trafficking by Acute Myelogenous Leukemia Exosomes // *Cancer Research* – 2013. – 73. – P. 918–29.
  59. Illanes S., Denbow M.L., Smith R.P. et al. Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine // *Prenat. Diagn.* – 2006. – 26. – P. 1216–8.
  60. Jahr S., Hentze H., Englisch S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells // *Cancer Res.* – 2001. – 61. – P. 1659–65.
  61. Jian G., Songwen Z., Ling Z. et al. Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2010. – 136. – P. 1341–6.
  62. Jiang N., Reich C.F., Pisetsky D.S. The role of macrophages in generation of circulation blood nucleosomes from dead and dying cells // *Blood* – 2003. – P. 2002–2010.
  63. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond // *Nat Rev Genet* – 2012. – 13. – P. 484–92.
  64. Kamat A.A., Baldwin M., Urbauer D. et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker // *Cancer* – 2010. –

116. – P. 1918–25.
65. Kamat A.A., Sood A.K., Dang D. et al. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – 1075. – P. 230–4.
66. Kharaziha P., Ceder S., Li Q., Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle // *Biochim. Biophys. Acta* – 2012. – 1826. – P. 103–11.
67. Kim B.K., Park J.Y., Kim d.Y. et al. Persistent hepatitis B viral replication affects recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection // *Liver Int.* – 2008. – 28. – P. 393–401.
68. Kimura H., Fujiwara Y., Sone T. et al. EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib // *Br. J. Cancer* – 2006. – 95. – P. 1390–5.
69. Koide K., Sekizawa A., Iwasaki M. et al. Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women // *Prenat. Diagn.* – 2005. – 25. – P. 604–7.
70. Koprski M.S., Benko F.A., Kwee C. et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer // *Br. J. Cancer* – 1997. – 76. – P. 1293–9.
71. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y. et al. Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – 1022. – P. 221–7.
72. Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M. et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma // *Br. J. Haematol.* – 2008. – 141. – P. 672–5.
73. Leung S.F., Zee B., Ma B.B. et al. Plasma Epstein-Barr viral deoxyribonucleic acid quantitation complements tumor-node-metastasis staging prognostication in nasopharyngeal carcinoma // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – 24. – P. 5414–8.
74. Lichtenstein A.V., Kissel'jova N.P. DNA methylation and carcinogenesis // *Biochemistry (Mosc.)* – 2001. – 66. – P. 235–55.
75. Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. Circulating nucleic acids and apoptosis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. – 945. – P. 239–49.
76. Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. Novel applications of polymerase chain reaction to urinary nucleic acid analysis // *Methods Mol. Biol.* – 2006. – 336. – P. 145–54.
77. Lo Y.M., Chan A.T., Chan L.Y. et al. Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P. 6878–81.
78. Lo Y.M., Chan L.Y., Lo K.W. et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Res.* – 1999. – 59. – P. 1188–91.
79. Lo Y.M., Leung S.F., Chan L.Y. et al. Kinetics of Plasma Epstein-Barr Virus DNA during Radiation Therapy for Nasopharyngeal Carcinoma // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P. 2351–5.
80. Lo Y.M., Leung S.F., Chan L.Y. et al. Plasma cell-free Epstein-Barr virus DNA quantitation in patients with nasopharyngeal carcinoma. Correlation with clinical staging // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – 906. – P. 99–101.
81. Lo Y.M.D., Chan K.C.A., Sun H. et al. Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and Mutational Profile of the Fetus // *Science Translational Medicine* – 2010. – 2. – P. 61ra9.1
82. Majer S., Bauer M., Magnet E. et al. Maternal urine for prenatal diagnosis--an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester // *Prenat. Diagn.* – 2007. – 27. – P. 1219–23.
83. Mandel P., Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. // *C. R. Acad. Sci. Paris* – 1948. – 142. – P. 241–3.
84. Margulies M., Egholm M., Altman W.E. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // *Nature* – 2005. – 437. – P. 376–80.
85. Melkonyan H.S., Feaver W.J., Meyer E. et al. Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 73–81.
86. Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer // *Nature* – 2012. – 486. – P. 532–6.
87. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 2008. – 105. – P. 10513–8.
88. Miura N., Nakamura H., Sato R. et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer // *Cancer Sci.* – 2006. – 97. – P. 1366–73.
89. Moulriere F., Robert B., Arnau Peyrotte E. et al. High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA // *PLoS ONE* – 2011. – 6. – P. e23418.
90. Nawroz H., Koch W., Anker P. et al. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients // *Nat. Med.* – 1996. – 2. – P. 1035–7.
91. Ng E.K., Chong W.W., Jin H. et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening // *Gut* – 2009. – 58. – P. 1375–81.
92. Ng E.K., Tsui N.B., Lam N.Y. et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals // *Clin Chem.* – 2002. – 48. – P. 1212–17.
93. O'Driscoll L., Kenny E., Mehta J.P. et al. Feasibility and relevance of global expression profiling of gene transcripts in serum from breast cancer patients using whole genome microarrays and quantitative RT-PCR // *Cancer Genomics Proteomics.* – 2008. – 5. – P. 94–104.
94. Шаном В.С. Нуклеазы. – Издательство «Медицина», 1967. – 20. – P. 22–6.
95. Orozco A.F., Lewis D.E. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma // *Cytometry A* – 2010. – 77. – P. 502–14.
96. Peinado H., Aleckovic M., Lavotshkin S. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET // *Nat Med* – 2012. – 18. – P. 883–91.
97. Roth C., Rack B., Muller V. et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2010. – 12. – P. R90.
98. Rykova E.Y., Laktionov P.P., Skvortsova T.E. et al. Extracellular DNA in breast cancer: Cell-surface-bound, tumor-derived extracellular DNA in blood of patients with breast cancer and nonmalignant tumors // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – 1022. – P. 217–20.
99. Salani R., Davidson B., Fiegl M. et al. Measurement of cyclin E genomic copy number and strand length in cell-free DNA distinguish malignant versus benign effusions // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 5805–9.
100. Schubeler D. Epigenetic Islands in a Genetic Ocean // *Science* – 2012. – 338. – P. 756–7.
101. Schwarzenbach H., Alix-Panabieres C., Muller I. et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – 15. – P. 1032–8.
102. Schwarzenbach H., Chun F.K., Lange I. et al. Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate

- cancer // *Int. J. Cancer* – 2007. – 120. – P. 1465–71.
103. *Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K.* Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients // *Nat Rev Cancer* – 2011. – 11. – P. 426–37.
104. *Schwarzenbach H., Pantel K., Kemper B. et al.* Comparative evaluation of cell-free tumor DNA in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2009. – 11. – P. R71.
105. *Schwarzenbach H., Stoehlmacher J., Pantel K., Goekkurt E.* Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 190–6.
106. *Shekhtman E.M., Anne K., Melkonyan H.S. et al.* Optimization of transrenal DNA analysis: detection of fetal DNA in maternal urine // *Clin. Chem.* – 2009. – 55. – P. 723–9.
107. *Shinozaki M., O'Day S.J., Kitago M. et al.* Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 2068–74.
108. *Shotelersuk K., Khorprasert C., Sakdikul S. et al.* Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – 6. – P. 1046–51.
109. *Sidransky D.* Emerging molecular markers of cancer // *Nat. Rev. Cancer* – 2002. – 2. – P. 210–9.
110. *Silva J.M., Silva J., Sanchez A. et al.* Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – 8. – P. 3761–6.
111. *Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N. et al.* Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation // *Br. J. Cancer* – 2006. – 94. – P. 1492–5.
112. *Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H. et al.* Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 1994. – 3. – P. 67–71.
113. *Sozzi G., Conte D., Leon M. et al.* Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – 21. – P. 3902–8.
114. *Sozzi G., Conte D., Mariani L. et al.* Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients // *Cancer Res.* – 2001. – 61. – P. 4675–8.
115. *Stroun M., Maurice P., Vasioukhin V. et al.* The origin and mechanism of circulating DNA // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – 906. – P. 161–8.
116. *Su Y.H., Wang M.E., Block T.M. et al.* Transrenal DNA as a Diagnostic Tool: Important Technical Notes // *Ann NY Acad Sci* – 2004. – 1022. – P. 81–9.
117. *Su Y.H., Wang M., Aiamkitsumrit B. et al.* Detection of a K-RAS mutation in urine of patients with colorectal cancer // *Cancer Biomarkers* – 2005. – 1. – P. 177–82.
118. *Su Y.H., Wang M., Brenner D.E. et al.* Human Urine Contains Small, 150 to 250 Nucleotide-Sized, Soluble DNA Derived from the Circulation and May Be Useful in the Detection of Colorectal Cancer // *J Mol Diagn* – 2004. – 6. – P. 101–7.
119. *Sunami E., Shinozaki M., Higano C.S. et al.* Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients // *Clin. Chem.* – 2009. – 55. – P. 559–67.
120. *Sunami E., Vu A.T., Nguyen S.L. et al.* Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 171–4.
121. *Suzuki H., Itoh F., Toyota M. et al.* Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer // *Int. J. Cancer* – 1999. – 83. – P. 309–13.
122. *Swami M.* Cancer: Exosomes from the stroma // *Nat Med* – 2013. – 19. – P. 142.
123. *Taback B., Giuliano A.E., Hansen N.M. et al.* Detection of tumor-specific genetic alterations in bone marrow from early-stage breast cancer patients // *Cancer Res.* – 2003. – 63. – P. 1884–7.
124. *Taback B., O'Day S.J., Hoon D.S.* Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – 1022. – P. 17–24.
125. *Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V. et al.* Circulating DNA and DNase activity in human blood // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – 1075. – P. 191–6.
126. *The ENCODE Project Consortium.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome // *Nature* – 2012. – 489. – P. 57–74.
127. *Toyota M., Ahuja N., Ohe-Toyota M. et al.* CpG island methylator phenotype in colorectal cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 1999. – 96. – P. 8681–6.
128. *Toyota M., Ho C., Ahuja N. et al.* Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification // *Cancer Res.* – 1999. – 59. – P. 2307–12.
129. *Trevisiol C., Di F.F., Nascimbeni R. et al.* Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutations in colorectal cancer with distant metastases // *Int. J. Biol. Markers* – 2006. – 21. – P. 223–8.
130. *Tricoli J.V., Jacobson J.W.* MicroRNA: Potential for Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis // *Cancer Research* – 2007. – 67. – P. 4553–5.
131. *Umetani N., Giuliano A.E., Hiramatsu S.H. et al.* Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – 24. – P. 4270–6.
132. *Umetani N., Kim J., Hiramatsu S. et al.* Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats // *Clin. Chem.* – 2006. – 52. – P. 1062–9.
133. *Wimberger P., Roth C., Pantel K. et al.* Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients // *Int. J. Cancer* – 2011. – 128. – P. 2572–80.
134. *Wong B.C., Chan K.C., Chan A.T. et al.* Reduced plasma RNA integrity in nasopharyngeal carcinoma patients // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – 12. – P. 2512–6.
135. *Wong I.H., Lo Y.M., Yeo W. et al.* Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – 6. – P. 3516–21

## СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| ENCODE | – Encyclopedia of DNA Elements, |
| SAP    | – serum amyloid P (components), |
| SINE   | – short interspersed elements), |
| LOH    | – loss-of-heterozygosity.       |

УДК 616-006.6-097:577.2.08:616-073.524

*К.И. Бражник<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>1,2</sup>, З.А. Соколова<sup>1,2</sup>, И.Р. Набиев<sup>1,3</sup>, А.В. Суханова<sup>1,3</sup>*  
**НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ И РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА  
С ПРИМЕНЕНИЕМ ДЕТЕКЦИОННЫХ СИСТЕМ  
НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ**

<sup>1</sup>Национальный Исследовательский Ядерный Университет «МИФИ», Москва<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва<sup>3</sup>Европейская Технологическая Платформа «Полупроводниковые Нанокристаллы», Лаборатория по исследованиям в области нанонаук – EA4682, Университет г. Реймс, Шампань-Арденн, Франция**Контактная информация**

Суханова Алена Владимировна, канд.биол. наук, руководитель группы наномедицины лаборатории нано-биоинженерии

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

e-mail: [nanomedicine.mephi@gmail.com](mailto:nanomedicine.mephi@gmail.com)

Статья поступила: 17.06.2013, принята к печати 09.07.2013.

**Резюме**

Современные подходы к клинической диагностике раковых заболеваний человека в большинстве случаев позволяют детектировать патологию уже на определенной стадии ее развития. Стандартные принципы детекции злокачественных новообразований ограничены набором классических методов: биохимическое и иммунологическое определение онкомаркеров, морфологическое и иммуноцитохимическое исследование биопсийных образцов тканей, инструментальные методы исследования. Разработка сверхчувствительных многопараметрических систем для детекции аутоантител к опухолевым антигенам в последнее время представляет наибольший интерес для ранней и своевременной диагностики развития заболевания. Успешное развитие технологии создания и применения суспензионных многопараметрических систем на основе флуоресцентных нанокристаллов (квантовых точек, КТ) открывает широкие перспективы в решении актуальной проблемы ранней диагностики рака.

По сравнению с классическими органическими флуорофорами, КТ обладают характерными преимуществами. Среди них: высокая яркость свечения, узкий и симметричный спектр флуоресценции, возможность использования единого источника излучения для возбуждения КТ различных цветов, высокая фотостабильность и возможность возбуждения в двухфотонном режиме. Благодаря своим уникальным спектральным свойствам, КТ могут использоваться как эффективные доноры энергии при Ферстеровском резонансном переносе энергии на подходящий акцептор. Такая возможность позволяет значительно усовершенствовать качество детекции и повысить порог чувствительности и специфичности диагностической системы. Кроме этого, недавно были продемонстрированы перспективы приложения суспензионных систем на основе КТ в клинической протеомике.

В настоящем обзоре обобщены последние достижения в области разработки и применения детекционных систем на основе флуоресцентных нанокристаллов, а также изложены перспективы использования таких систем для ранней многопараметрической диагностики рака в ближайшем будущем.

**Ключевые слова:** опухолевые маркеры, антигены, аутоантитела, полупроводниковые нанокристаллы, квантовые точки, микросферы, проточная цитометрия, Ферстеровский резонансный перенос энергии; мультифотонное возбуждение.

*K.I. Brazhnik<sup>1</sup>, M.A. Baryshnikova<sup>1,2</sup>, Z.A. Sokolova<sup>1,2</sup>, I.R. Nabiev<sup>1,3</sup>, A.V. Sukhanova<sup>1,3</sup>*  
**NEW TRENDS IN THE STUDY AND EARLY DIAGNOSIS OF CANCER  
WITH THE USE OF DETECTION SYSTEMS BASED  
ON FLUORESCENT NANOCRYSTALS**

<sup>1</sup>National Research Nuclear University «Moscow Engineering Physics Institute», Moscow<sup>2</sup>FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow<sup>3</sup>European Technological Platform «Semiconductor Nanocrystals», EA4682 – Laboratory of Research in Nanosciences, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France**Abstract**

Most modern approaches to clinical diagnosis of human cancers allow the detection of tumors at a certain stage of development. The standard principles of malignant tumor detection are limited by the set of classical methods: biochemical and immunological detection of tumor markers, morphological and immunohistochemical examination of tissue biopsies, and instrumental methods. Recent development of ultrasensitive multiplexed systems for detection of antibodies against tumor antigens has been proved to be effective for early and timely diagnosis of the disease. The successful development of production technologies and application of suspension multiplexed systems based on fluorescent nanocrystals (quantum dots, QDs) holds considerable promise for solving the urgent problem of early cancer diagnostics.

Compared to conventional organic fluorophores, QDs have distinctive advantages, including a high brightness, a narrow and symmetrical fluorescence spectrum, the possibility to use a single light source for excitation of QDs of different colors, a high photostability, and the possibility of two-photon excitation. Due to their unique spectral properties, QDs can be used as efficient donors in FRET to an available acceptor. This makes it possible to significantly improve the specificity and sensitivity of the diagnostic system. In addition, the prospects of using QD-based suspension systems in clinical proteomics have been recently demonstrated.

This review summarizes recent advances in the development and applications of detection systems based on fluorescent nanocrystals and the prospects of the application of these systems to early multiplexed diagnostics of cancer in the near future.

**Keywords:** tumor markers, antigens, autoantibodies, semiconductor nanocrystals, quantum dots, beads, flow cytometry; Förster resonance energy transfer; multiphoton excitation.

### Введение

Своевременная высокоточная диагностика онкологических заболеваний и разработка эффективных методов лечения являются наиболее актуальными задачами современной медицины. Для разработки эффективных методов диагностики и терапии онкологического заболевания необходимо понимать основные механизмы и принципы развития рака.

Злокачественная трансформация включает в себя изменения в экспрессии белков с последующей клональной пролиферацией измененных клеток. Аномальная экспрессия генов в опухолевых клетках обуславливает синтез эмбриональных, плацентарных и эктопических белков, ферментов, антигенов и гормонов [25].

Эти изменения можно контролировать на уровне опухолевых маркеров (биомаркеров) и качественно, и количественно. Опухолевые маркеры (биомаркеры) являются важным информативным показателем наличия опухолевого процесса и представляют мощный инструмент для мониторинга и оценки эффективности проводимой терапии злокачественных новообразований. Они могут иметь огромное значение в клинической онкологии, если их концентрация в сыворотке крови коррелирует с наличием и ростом злокачественной опухоли до появления клинических симптомов.

Поиск, идентификация и качественный анализ специфических биомаркеров в биологических жидкостях и разработка высокоточных многопараметрических систем их детекции по-прежнему остаются наиболее актуальными задачами ранней диагностики и прогнозирования онкологических заболеваний. Существуют разнообразные геномные и протеомные технологии для мониторинга многочисленных изменений и процессов, протекающих в организме на молекулярном уровне: степень опухолеспецифичного метилирования ДНК [8; 46], модификация профилей мРНК [58], изменение уровня экспрессии и степени гликозилирования белков [34], появление антиген-специфических аутоантител [1; 4; 14; 23] и циркулирующих раковых клеток [21; 54] и т.д.

Тем не менее, несмотря на большое количество проводимых научных исследований, подавляющее большинство потенциальных онкомаркеров нового поколения не выдерживают полноценные клинические испытания для успешного применения их в клинической диагностике и практике [20]. Причины такого критического отбора заключаются в естественных различиях протеомных профилей индивидов, тонких вариациях методик отбора и обработки биологических проб, что может приводить к серьезным систематическим ошибкам, ограниченности технологических ресурсов для тестирования и методов ранней диагностики развития заболевания.

Несмотря на все эти ограничения, идеальный белковый онкомаркер должен отражать истинную биологическую гетерогенность в уровне экспрессии опухолевых белков в зависимости от стадии и типа заболевания, а идеальная диагностическая

система должна быть многопараметрической, высокоточной, а также несложной для использования в рутинной клинической практике.

### 1. Опухолевые маркеры

#### 1.1. Ассоциированные с опухолью антигены – классические онкомаркеры

С точки зрения диагностической ценности опухолевый антиген должен продуцироваться опухолевой клеткой в количествах, достаточных для обнаружения с помощью современных методов анализа. Кроме того, он не должен выявляться (или его уровень должен быть значительно меньше) в крови у здоровых людей или при доброкачественных опухолях.

Известно более 200 антигенных онкомаркеров, однако в клинической практике высокоспециализированных онкологических учреждений выявление опухолевых антигенов подтвердило их эффективность при раке предстательной железы (ПСА), герминогенных опухолях (АФП, ХГЧ), раке яичников (СА 125), раке шейки матки (SCC), трофобластических опухолях (ХГЧ), раке молочной железы (РЭА; СА 15.3), раке легкого (РЭА; CYFRA 21.1; HCE), раке толстой кишки (РЭА; СА 19.9), раке поджелудочной железы (СА 19.9), раке желудка (РЭА; СА 19.9; СА 72.4), первичном раке печени (АФП; СА 19.9), раке мочевого пузыря (CYFRA 21.1; UBC), меланоме (S 100). В применяемых и разрабатываемых диагностических системах пока используются известные опухолевые антигенные маркеры с ограниченной диагностической специфичностью и чувствительностью.

Несмотря на эти недостатки, единичная детекция опухолевых антигенов широко применяется в клинической практике, и вся история использования онкомаркеров в клинической диагностике – это постоянный поиск опухолеспецифичных тестов, способных выявить злокачественную опухоль, установить ее тип и локализовать на возможно более ранних этапах формирования. Традиционные иммунохимические методы позволяют определять концентрацию только одного опухолевого антигена в одном образце сыворотки крови, поэтому в настоящее время в области ранней диагностики большие надежды связывают с комплексными системами, которые позволяют проводить одновременный количественный многопараметрический анализ [40].

#### 1.2. Циркулирующие аутоантитела против ассоциированных с опухолью антигенов – ранние чувствительные индикаторы развития рака

Многочисленные исследования причин и механизмов возникновения и развития злокачественных раковых клеток показывают, что опухолевые антигены обладают иммуногенными свойствами и способны индуцировать продукцию специфических антител.

Причины и механизмы приобретения нормальными антигенами иммуногенных свойств до

сих пор не до конца установлены и изучены [82]. Однако очевидно, что структурные перестройки молекул или изменение профиля экспрессии клеточных белков во время трансформации опухолевых клеток приводят к активации иммунного ответа и продукции аутоантител [27; 68]. Собственные белки клетки могут в избытке экспрессироваться, подвергаться мутациям и нарушением структуры, деградаци, посттрансляционным модификациям, что в свою очередь приводит к активации аутореактивного иммунного ответа у онкологических пациентов [11] (рис. 1). Продукция аутоантител к опухолевому антигену может позволить детектировать появление малого количества антигена, ассоциированного с опухолью, еще на самых ранних стадиях опухолевого роста [15; 37; 66].

Циркулирующие аутоантитела в сыворотке крови онкологических пациентов используют для идентификации новых панелей антигенов, ассоциированных с опухолью, как потенциальных прогностических/диагностических маркеров и терапевтических мишеней [13]. Применение белковых чипов позволяет анализировать специфику гуморального иммунного ответа при развитии рака в отношении тысяч различных белковых мишеней [24; 69], выявляя новые панели антигенов, ассоциированных с опухолью и обладающих высокой иммуногенностью.

В настоящее время специфические аутоантитела к опухолевым антигенам признаны наиболее многообещающими диагностическими маркерами для ранней детекции патологии и контроля эффективности лечения. Идентификация профиля раковых аутоантел в сыворотке крови онкологических пациентов может способствовать выявлению комплексных признаков определенной стадии или типа заболевания, облегчить разработку и испытание противораковых вакцин. Кроме того, аутоантитела, выявление которых ассоциировано с улучшением прогностических показателей заболевания, могут представлять новый класс потенциально эффективных иммунотерапевтических молекул.

Существует несколько прототипных технологий для детекции аутоантител и опухолевых антигенов, выявления корреляции между профилем экспрессии маркеров и развитием онкологического заболевания, изучения механизмов их функционирования. Однако после идентификации потенциальных опухолевых антигенов необходимо установить и подтвердить их функциональность как опухолевых биомаркеров для клинической диагностики заболевания.

С этой целью выполняют хорошо воспроизводимые и недорогие аналитические исследования и тесты с использованием большого количества сывороток. Но основные аналитические подходы для детекции онкомаркеров обладают характерными недостатками и ограничениями, такими как низкая скорость и недостаточные точность, чувствительность, эффективность анализа.

В настоящее время по-прежнему существует необходимость разработки высокоточных и сверхчувствительных методов многопараметрического анализа для детекции даже небольших количеств онкомаркеров в сыворотке крови. В этой связи, нанотехнологические подходы к детекции онкомаркеров и создание принципиально нового поколения систем для клинической диагностики рака на основе полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов являются многообещающими направлениями наномедицины.

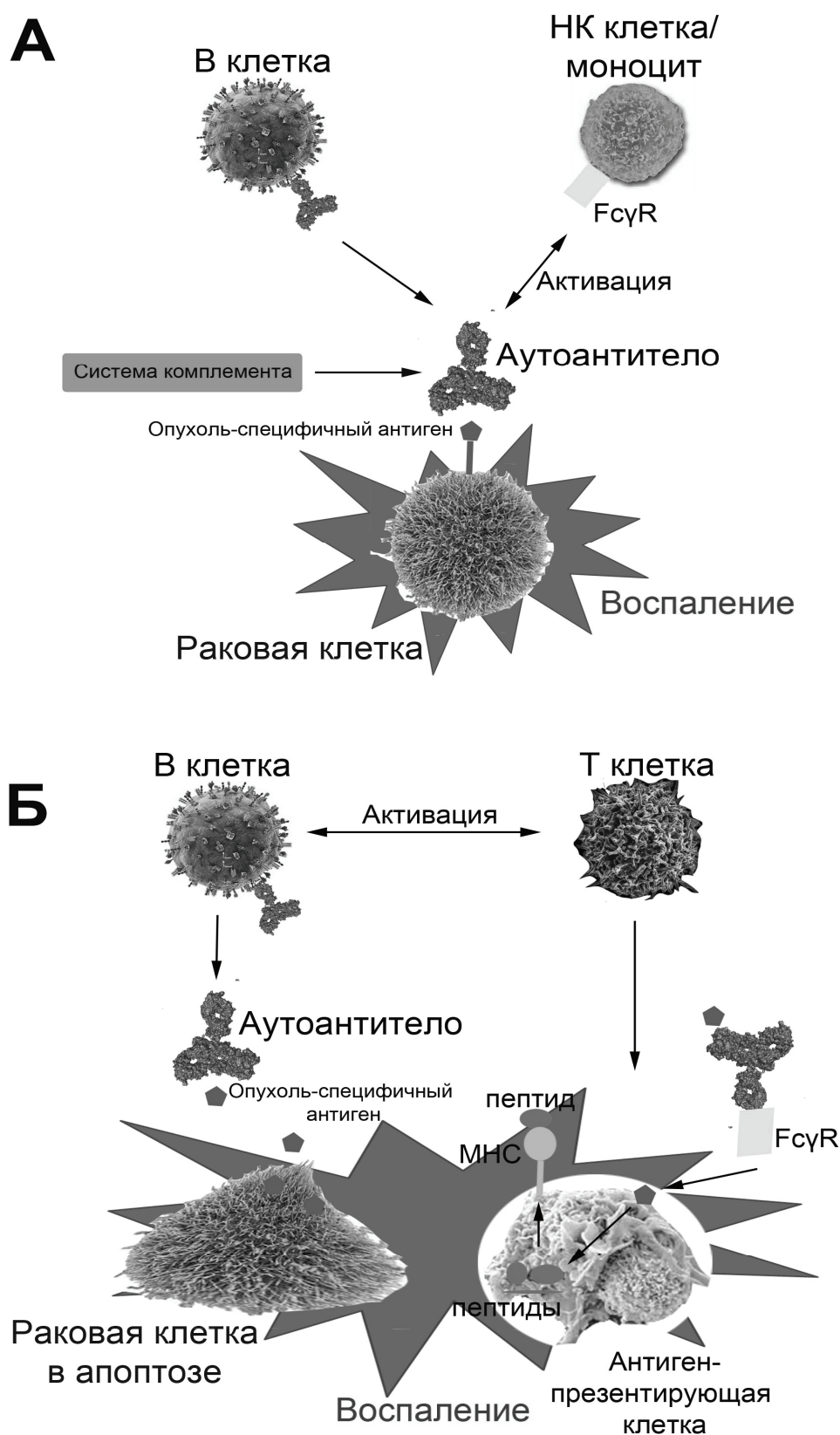
## 2. Характеристика и свойства флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов (КТ)

Флуоресцентные маркеры используются в качестве основного инструмента для визуализации многих процессов в биологических системах *in vivo* и *in vitro* [50; 72; 81]. Благодаря достижениям в области нанотехнологии был получен новый класс усовершенствованных флуорофоров – полупроводниковых нанокристаллов размером 2–6 нм (КТ). КТ обладают рядом уникальных свойств, которые делают их идеальными флуоресцентными маркерами и дают им неоспоримое преимущество перед классическими органическими флуорофорами для различных биологических приложений [49; 51; 57; 81].

Для КТ характерны уширенные области поглощения и возбуждения и, в то же время, узкие и симметричные спектры флуоресценции. При этом положение максимума флуоресценции определяется размером ядра нанокристалла. КТ разных размеров могут возбуждаться единым источником излучения и испускать флуоресценцию разных цветов, что практически невыполнимо в случае органических красителей. Для КТ также характерны высокие коэффициенты экстинкции, а следовательно, и усиленная яркость излучения. Более того, по сравнению с органическими флуорофорами КТ обладают высокой фотостабильностью и устойчивостью к выцветанию. Другим уникальными преимуществами КТ является возможность двухфотонного возбуждения, что позволяет значительно усовершенствовать качество детекции и визуализации различных биологических процессов. Также КТ могут выступать в роли эффективных доноров в процессах Ферстеровского резонансного переноса энергии.

Свойства КТ зависят от химического состава, размера частиц, химии поверхности. Как правило, КТ, используемые для биологических приложений, состоят из фотолюминесцентного полупроводникового ядра селенида кадмия (CdSe), дополнительно ядро может быть покрыто оболочкой сульфида цинка (ZnS). Для большинства биологических приложений необходима адаптация КТ к водной среде. Получение водорастворимых частиц предусматривает дополнительную модификацию поверхности КТ с помощью тиол-содержащих молекул с экспонированными карбоксильными, гидроксильными или амино-группами. Это дополнительно защищает поверхность КТ от ферментативного и химического воздействия биологических жидкостей и предоставляет возможность для конъюгации с биомолекулами [49; 73]. При поглощении света КТ происходит перенос возбужденных электронов из зоны валентности в зону проводимости, при этом валентный уровень остается свободным (рис. 2). Ввиду малых размеров ядра полупроводникового нанокристалла экситонный переход возможен на короткие дискретные расстояния – ширину запрещенной зоны. В процессе обратного переноса экситона на валентный уровень происходит испускание энергии и излучение флуоресценции. Ширина запрещенной зоны перехода возбужденного экситона определяется размером ядра нанокристалла. Благодаря этому при возвращении электрона в состояние покоя излучается свет разных длин волн [51].

Кроме того, КТ обладают высокой эффективностью двухфотонного поперечного поглощения. При интенсивном облучении нанокристалла длиной волны в красной области спектра возможно поглощение двух фотонов с меньшей энергией и возбуждение электрона.



**Рис. 1. Предположительные механизмы развития противоопухолевого иммунного ответа, индуцированного аутоантителами:**

А – Механизм взаимодействия аутоантитела с поверхностным опухолеспецифичным антигеном. Индукция клеточной цитотоксичности и системы комплемента.

Б – Механизм взаимодействия аутоантитела с внутриклеточным опухолеспецифичным антигеном. Комплекс аутоантитело-опухолевый антиген связывается с Fcγ-рецептором антиген-презентирующей клетки. Опухолеспецифичный антиген внутриклеточно расщепляется до пептидов и в составе МНС II (главного комплекса гистосовместимости) презентуется цитотоксическим клеткам.

В результате также происходит испускание энергии и флуоресценция при переходе возбужденного электрона на базовый валентный уровень (рис. 2). Поскольку вероятность одновременного поглощения фотонов низка, для двухфотонного возбуждения флуоресценции нанокристалла необходим постоянный поток фотонов, обеспечиваемый фокусируемым импульсным (фемтосекундным) инфракрасным лазером [83]. Свойство двухфотонного возбуждения нанокристаллов активно используется в двухфотонной спектроскопии и проточной флуориметрии для прижизненной визуализации клеток и тканей, мониторинга минорных популяций циркулирующих раковых клеток [42; 45; 70].

Было также показано, что флуоресцентные нанокристаллы могут выступать в роли эффективных доноров в Ферстеровском резонансном переносе энергии.

Во-первых, контролируя размер наночастицы можно регулировать смещение максимума и общий спектр флуоресценции кристалла. Это необходимо для коррекции перекрывания спектра флуоресценции донора (КТ) и спектра поглощения акцептора в паре.

Во-вторых, несколько разных акцепторов органического происхождения могут взаимодействовать с единственным донором КТ. Это позволяет усовершенствовать эффективность переноса энергии [35].

Возможность участия флуоресцентных нанокристаллов в Ферстеровском резонансном переносе энергии активно используется в различных высокочувствительных схемах для мониторинга внутриклеточных процессов и взаимодействий [41; 48; 60].

### 3. Области применения квантовых точек и перспективы использования в клинической диагностике рака

#### 3.1. Иммуногистохимическое окрашивание клеток и тканей с помощью КТ: детекция клеточных маркеров и рецепторов

С успешным развитием эпохи нанотехнологии, флуоресцентные нанокристаллы привлекают все больший научный интерес в области биологических исследований. КТ активно адаптируют для флуоресцентной визуализации биомолекул и маркеров (рецепторы клеточной поверхности, компоненты цитоскелета, ядерные и цитоплазматические антигены). Разработаны эффективные технологии целевой доставки КТ в разные компартменты клетки (цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, ядро) в различных типах образцов (культуры клеток, фиксированные образцы клеток, срезы тканей), как то: эндцитоз, прямая микроинъекция, электропорация, опосредованное поглощение, целевая доставка, избирательная специфичная маркировка белков клеточной поверхности [22]. В настоящее время опубликовано достаточно много интересных работ в области индивидуальной и многопараметрической иммуногистохимической детекции различных клеточных мишеней с использованием КТ [67; 76].

Возможность использования флуоресцентных нанокристаллов для детекции антигена в фиксированных образцах клеток была впервые описана Bruchez с соавт. в 1998 году [9]. Вскоре после этого, с помощью зеленых и красных КТ удалось одновременно маркировать ядерные антигены и F-актиновые

филаменты в культуре фиксированных фибробластов мыши. Детализированная трехмерная структура цитоскелета была реконструирована с помощью конфокальной микроскопии. Качество изображений, параметры разрешения и правильность графического воссоздания молекулярных структур с использованием КТ оптимизированы и сопоставимы с данными по классической детекции со стандартными красителями Alexa [76]. Другой группе ученых в своих исследованиях удалось одновременно комбинировать для детекции три вида КТ (КТ 655; 705 и 800), классические флуорохромы DAPI и Alexa 555 и зеленый флуоресцентный белок GFP [43]. Ness с соавт. разработали комплексную процедуру иммуногистохимического окрашивания для высокочувствительной детекции внутриклеточных антигенов в тканях мозга грызунов. Предложенная схема сочетает в себе принципы маркировки с помощью биоконыюгатов КТ и ферментативного усиления сигнала [52].

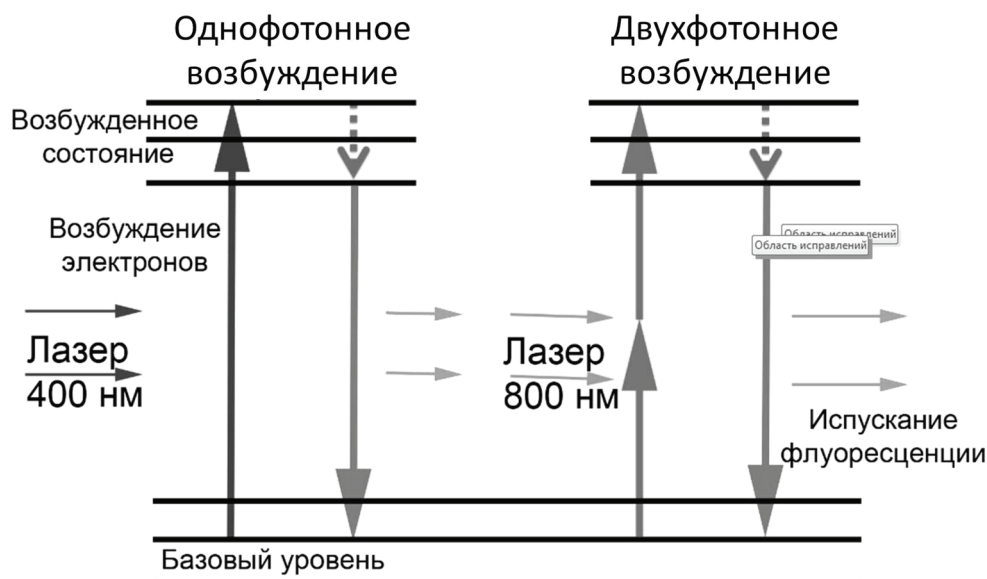
Основные иммуногистохимические исследования с использованием КТ были выполнены на клеточных линиях или свежееизолированных образцах тканей. Однако, большинство получаемых клинических образцов тканей пациентов, как правило, фиксированы в формалине или заключены в парафин (FFPE) и должны храниться в течение нескольких лет. Процедуры маркировки с помощью КТ также удалось успешно адаптировать для детекции до четырех различных биомолекул в фиксированных образцах тканей пациентов [7; 77].

Помимо этого, КТ были адаптированы для маркировки и визуализации в многопараметрическом анализе на тканевых микрочипах. Так называемые тканевые микрочипы позволяют исследовать большое количество образцов тканей одновременно с помощью иммуногистохимического окрашивания. Caldwell с коллегами использовали два вида КТ (КТ 605 и 705) для количественной детекции белковых мишеней MDM-2 and  $\beta$ -актина одновременно в 25 образцах ткани почечной карциномы [10]. Преимущества использования КТ для иммуногистохимического окрашивания тканевых микрочипов также были продемонстрированы на модели рака легкого. Анализируя уровень кавеоллина-1 и PCNA в качестве модельных антигенов, исследователи пришли к выводу, что детекция с помощью КТ превосходит классические методы окрашивания [19]. Эта же группа ученых использовала конъюгаты стрептавидина с КТ 605 и 545 для оценки статуса HER 2 при раке молочной железы. Аналогичным образом исследователи показали, что такой подход к окрашиванию образцов характеризуется большей чувствительностью и точностью по сравнению с использованием органических флуорофоров. Это оказалось особенно критично для идентификации низкого уровня экспрессии HER2 и его предшественника ER белка [18].

#### 3.2. Многоцветная проточная цитофлуориметрия: иммунофенотипирование клеточных субпопуляций с помощью КТ

Аналитический метод проточной цитометрии является основным инструментом для идентификации клеточных популяций, принимающих участие в процессах нормального функционирования организма и развития различных патологий. В практических приложениях эта задача осложнена тем фактом, что любая клетка может экспрессировать широкий профиль белков и рецепторов.





**Рис. 2.** Схематическая диаграмма процессов однофотонного и двухфотонного поглощения и испускания энергии:

При облучении флуоресцентной частицы светом происходит индуцированный переход электронов между различными энергетическими уровнями. Часть полученной системой энергии испускается в результате релаксации электрона с возбужденного на базовый энергетический уровень. Разница энергии между энергетическими уровнями и частота колебаний поглощенного света определяют спектр флуоресценции. В случае однофотонного возбуждения частица поглощает один фотон с более короткой длиной волны, чем у излучаемого фотона. При двухфотонном возбуждении половина энергии эффективно поглощается и испускается при релаксации электрона на базовый уровень, оставшаяся энергия рассеивается. Вероятность поглощения одной молекулой двух возбуждающих фотонов очень мала. Поэтому необходим интенсивный поток возбуждающих фотонов, который можно получить при помощи фокусированного фемтосекундного лазера, испускающего фотоны с большой частотой следования импульсов.

Зачастую неизвестно или строго не определено, какие качественные и количественные комбинации и сочетания белков являются уникальными для определенного типа клеток. Таким образом, количественное определение целого профиля белков является важной задачей для характеристики того или иного процесса и популяции клеток, принимающих в нем участие. В случае, если количество образца ограничено или важна точная оценка соотношения и взаимодействия белков, возникает острая необходимость в многопараметрической детекции. Эту задачу успешно помогают решать проточная цитометрия с применением КТ.

Серьезное научное достижение в области применения КТ для многопараметрического анализа фенотипа индивидуальных Т-клеточных популяций методом проточной цитометрии продемонстрировали Chattopadhyay и соавт. [16; 17; 56]. В этой работе авторы изучали механизмы адаптивного иммунитета и идентифицировали EBV, CMV, HIV Nef, and HIV Gag -специфические CD8 + Т-клеточные популяции в образцах крови ВИЧ-инфицированных пациентов.

Благодаря уникальным спектральным свойствам КТ, исследователи создали панель из 17 различных флуорофоров, включающую семь типов КТ и десять органических красителей [17; 56]. КТ были конъюгированы с антителами против CD4, CD45RA и CD57-рецепторов, а также специфическими мультимерами пептидов МНС класса I (pMHC1) для детекции EBV-, CMV-, HIV-специфических цитотоксических лимфоцитов [2; 17] (рис. 3).

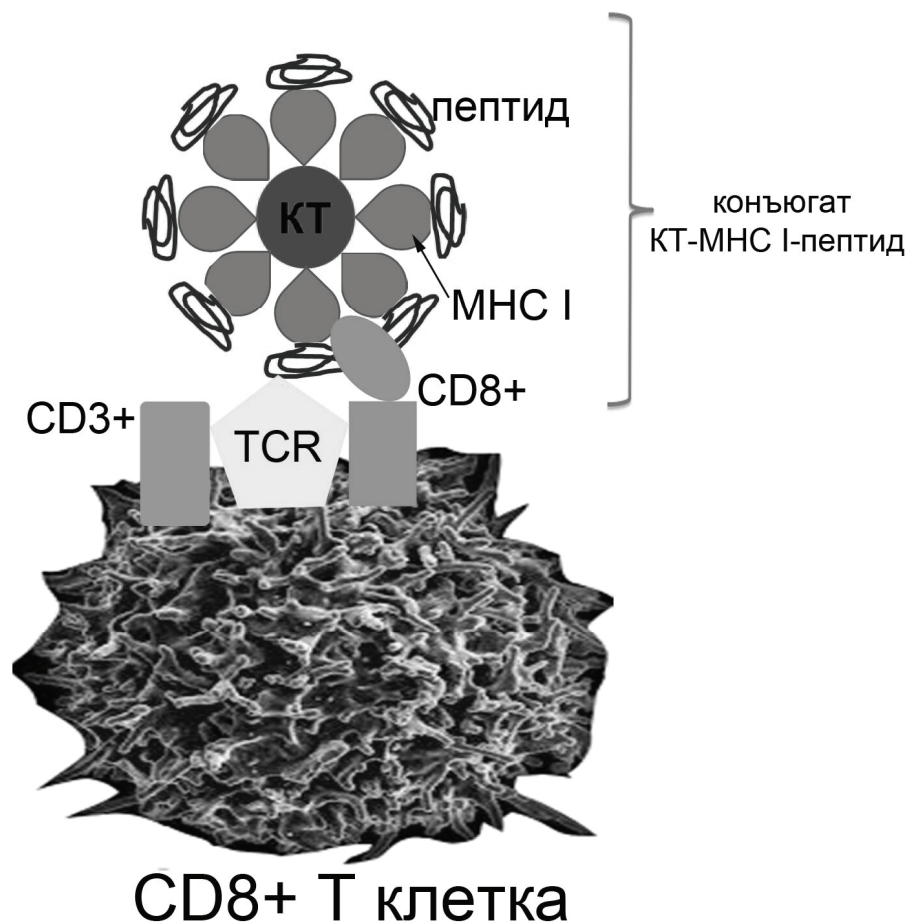
Chattopadhyay и соавт. разработали особую конфигурацию проточного цитометра, оснащенного несколькими фильтрами, детекторами и лазера-

ми. Это позволило максимально увеличить количество флуорофоров, которые могут быть идентифицированы при возбуждении одним источником излучения. Благодаря такой конструкции флуоресценция всех типов КТ индуцировалась с помощью одного ультрафиолетового лазера 408 нм, это также помогло снизить интенсивность автофлуоресценции клеток [17; 56].

В этом исследовании наглядно продемонстрированы потенциал КТ для разработки новых многопараметрических подходов анализа. Существование нескольких фенотипически отличающихся субпопуляций в составе каждой антиген-специфической популяции Т-клеток дает представление о сложности механизмов развития Т-клеточного иммунитета. Разработка принципов применения иммуноанализных систем на основе КТ для определения фенотипа индивидуальных клеточных популяций может оказаться важным шагом в создании качественной и высокочувствительной многопараметрической диагностики в онкологии.

### 3.3. Мониторинг внутриклеточных процессов и взаимодействий с помощью квантовых точек

Широко известно, что механизм FRET активно используется для визуализации и контроля внутриклеточных взаимодействий и процессов. Благодаря успешному внедрению флуоресцентных наноматериалов в практику биологических исследований стало очевидно, что КТ могут быть гораздо более эффективными донорами в этом процессе, чем классические флуорофоры [35; 48]. Различные высокочувствительные схемы мониторинга внутриклеточных процессов были разработаны на основе КТ в качестве FRET доноров.



**Рис. 3.** Применение квантовых точек для иммунофенотипирования клеточных популяций цитотоксических лимфоцитов (CTL):

Схематическое изображение связывания конъюгата флуоресцентного нанокристалла с пептид-МНС I комплексом на мембране CD8 + T-клеток. Мультивалентные взаимодействия между мембранным CD8-корцептором и пептидом МНС I-комплекса определяют стабильность TCR/pMHC-I/CD8 комплексов и усиливают CD8 + T-клеточный ответ.

Наиболее распространенный пример определения активного аналита на основе механизма FRET заключается в вытеснении и замещении связанного тушителя флуоресценции. Показано, что в присутствии мальтозы происходит диссоциация комплекса циклодекстрина, меченого QSY-9, с MBP, конъюгированным с КТ, и восстановление флуоресценции КТ [48].

Чувствительные зонды на основе пептидов, конъюгированных с парами донор-акцептор, могут служить для определения специфической активности ряда протеолитических ферментов. Shi с соавт. создали зонд для реализации механизма FRET и измерения ферментативной активности трипсина, состоящий из пептида, конъюгированного с КТ в качестве донора и родамином в качестве акцептора. При направленном облучении и возбуждении КТ индуцируется эффективный перенос энергии на близкорасположенный флуорофор родамин. При расщеплении пептида трипсином процесс переноса энергии нарушается, сигнал флуоресценции КТ в образце возрастает до 60 %, а флуоресценция родамина, соответственно, исчезает [60].

Относительно недавно была продемонстрирована возможность использования КТ в качестве акцепторов в процессах BRET [61]. Эффект индукции флуоресценции КТ был показан в системе с

Luc8, вариантом люциферазы *R. reniformis*, конъюгированной с КТ. После добавления люминесцентного субстрата коэлюциферазина индуцировалась флуоресценция с максимумами на 480 нм (коэлюциферазин) и 655 нм (КТ). Эта схема также применима для высокочувствительной детекции активности протеаз [80].

В дополнение к схемам FRET and BRET, эффекты тушения переноса электронов могут быть использованы как альтернативный способ изучения механизмов биокаталитических процессов. Активность различных ферментов исследовали в схемах электронного тушения КТ. С помощью такого подхода можно оценить тирозиназную активность в присутствии КТ, покрытых монослоем метилового эфира тирозина. Индуцированное окисление тирозина и каталитическое превращение в субъединицы гасителя флуоресценции допахинона приводит к тушению флуоресценции КТ. Активность тирозиназы оценивается по степени угасания флуоресценции КТ при взаимодействии с различными концентрациями тирозиназы и различном времени каталитической реакции [30]. Помимо наглядной демонстрации мониторинга биокаталитических процессов анализ тирозиназной активности с использованием КТ имеет важное практическое значение. Повышенный уровень тирозиназы обнаружен в рако-

вых клетках меланомы, поэтому такой способ быстрой оптической детекции этого биомаркера с помощью КТ может быть полезным диагностическим приложением.

Таким образом, конъюгаты КТ с различными активными целевыми молекулами (белки, фрагменты антител, аптамеры ДНК) могут служить эффективными донорами FRET для детекции небольших молекул-аналитов в клинической диагностике [31; 48].

Кроме того, применение флуоресцентных нанокристаллов помогло решить технологические проблемы, связанные с прижизненной маркировкой и визуализацией структур *in vivo* [3; 42; 43], в том числе – с использованием метода двухфотонной спектроскопии. Последний считается одним из наиболее перспективных подходов для изучения структуры плотных образцов и живых тканей [44; 45]. Принцип двухфотонной микроскопии основан на нелинейном двухфотонном возбуждении флуоресцентных частиц фокусируемым импульсным (фемтосекундным) инфракрасным лазером (700–1000 нм) и регистрации флуоресценции в видимой области спектра. Облучение светом инфракрасного диапазона характеризуется гораздо большей проникающей и индуцирующей способностью, чем облучение светом видимой области спектра. Благодаря этому появляется возможность визуализировать структуры живых тканей в функционирующем организме *in vivo* [45].

С помощью КТ с максимумами флуоресценции в ближнем ИК диапазоне (840–860 нм) ученые визуализировали и картировали лимфатические узлы, первично подверженные метастазам, для направленных хирургических вмешательств у животных. Инъекция 400 пмоль КТ ближнего ИК-диапазона позволила идентифицировать метастазированные лимфоузлы в подкожном слое у свиней [42]. Таким образом, интраоперационная флуоресцентная микроскопия позволяет визуально идентифицировать лимфатический ток и первично метастазированные лимфоузлы без использования радиоактивных индикаторов или органических флуорофоров. Благодаря такой возможности может осуществляться направленное местное хирургическое вмешательство без повреждения здоровых тканей и структур.

В аналогичных исследованиях с помощью КТ были обнаружены желудочно-кишечные и легочные лимфатические узлы, подверженные раннему первичному метастазированию [55; 62]. Эти данные также предоставляют важную информацию для клинического картирования зон риска метастазирования опухоли в лимфатической системе и диагностирования рака.

#### 4. Многопараметрические суспензионные системы на основе микросфер, кодированных флуорофорами

Благодаря своим уникальным оптическим свойствам и характеристикам, полупроводниковые нанокристаллы являются идеальными флуоресцентными метками для клинической лабораторной диагностики [16; 42; 71]. Современные методы маркировки, визуализации и оптического кодирования анализируемых молекул с помощью КТ позволяют получать весьма информативные данные и знания о многих биологических процессах. Кроме того, с помощью оптического кодирования полимерных микросфер флуоресцентными нанокристаллами могут быть созданы многопараметриче-

ские системы анализа [64; 65; 75], необходимые для быстрого скрининга большого количества биомолекул одновременно [32; 75].

Оптически кодированные микросферы, оптимально подходят для анализа биологических образцов с помощью методов классической проточной цитометрии, высокочувствительной лазерной сканирующей цитометрии, а также CLSM. Большинство описанных оптически кодированных суспензионных систем состоят из полистирольных микросфер, в структуру которых включены несколько флуоресцентных красителей в разных количественных соотношениях.

При включении в состав микросфер различных концентраций флуоресцентных красителей с разными спектрами излучения удастся получить набор микросфер с уникальными спектральными кодами (рис. 4). Теоретически возможное число кодов определяется количеством красителей и количеством уровней интенсивности их излучения и рассчитывается в соответствии с уравнением:

$$C = Nm - 1, \text{ где}$$

$C$  (величина) определяет теоретически возможное число спектральных кодов,

$N$  – число уровней интенсивности, а  $m$  – количество цветов (флуорофоров).

Фактическое число кодов, однако, оказывается ниже в связи с перекрыванием спектров, разницей в интенсивности флуоресценции красителей и требованиями к соотношению сигналов флуоресценции и фона [32].

В настоящее время существует 2 разные стратегии многоцветного оптического кодирования микросфер для биологических исследований: использование классических органических флуорофоров и включение в микросферы полупроводниковых нанокристаллов различных цветов [32; 65].

Последние успешные достижения в области многопараметрической детекции заключаются в разработке компанией *Luminex* суспензионной системы кодированных микросфер для анализа биологических образцов методом проточной цитометрии (*MFCA*) [28; 65]. Технология *Luminex* подразумевает включение трех видов органических красителей в 10 различных концентрационных соотношениях в состав полистирольных микросфер размером 5,6 мкм. Далее, кодированные сферы конъюгируют с индивидуальными молекулярными зондами, которые распознают и связывают анализируемые молекулы в биологическом образце. Вариации количественных соотношений трех органических красителей позволяют получить до 500 спектральных кодов микросфер, конъюгированных с различными биологическими зондами. Количественная оценка сигнала флуоресценции микросфер и интенсивности флуоресцентного сигнала референсной метки осуществляется с помощью классической проточной цитометрии. Поскольку каждый отдельный тип микросфер может быть идентифицирован с помощью проточной цитометрии, большое число различных молекул может быть детектировано одновременно [65]. Такая возможность предоставляет свободу для многопараметрического определения большого числа анализируемых параметров в 1 образце. Суспензионная система оптически кодированных микросфер, разработанная компанией *Luminex*, успешно используется для широкого спектра анализов, в том числе – для детекции цитокинов [39] и ряда других белков и ферментов, ви-

русов иммунодефицита человека и гепатита В [47], SNP [33], определения уровня тиреоидного гормона [5], скрининга аллергических реакций [74], диагностики инфекционных заболеваний [79] и проч.

Относительно недавно была разработана альтернативная стратегия многоцветного кодирования микросфер флуоресцентными полупроводниковыми нанокристаллами, обладающими уникальными оптическими свойствами и характеристиками [29; 64].

Существует несколько альтернативных способов включения КТ в состав микросферы. Кодирование может быть реализовано путем частичного разрушения полистирольных сфер в органических растворителях с последующей загрузкой флуоресцентных нанокристаллов [32; 63], непосредственного включения метки во время синтеза микросферы [38; 59] и формирования многослойной полимерной оболочки на поверхности сферы с включением между слоями КТ [12; 75].

Принципы кодирования (рис. 4) и спецификации микросфер с помощью молекулярных зондов и многопараметрическая детекция с использованием такой суспензионной системы во многом аналогичны технологии, разработанной *Luminex*.

Однако стоит отметить, что система кодированных микросфер, разработанная *Luminex*, обладает серьезными недостатками и ограничениями в использовании по сравнению с суспензией микросфер, кодированных КТ [32; 64].

Прежде всего, увеличение числа органических красителей в составе кодированных микросфер и детекторных меток требует оснащения цитометра несколькими лазерами возбуждающего света. Это значительно увеличивает стоимость декодирующего прибора. В тоже время флуоресценция различных популяций КТ эффективно индуцируется светом одной длины волны благодаря тому, что для всех нанокристаллов характерны широкие спектры поглощения. Во-вторых, органические красители, входящие в состав микросфер *Luminex*, обладают низким порогом фотообесцвечивания и широкими спектрами флуоресценции, что повышает вероятность перекрытия спектров поглощения и испускания разных красителей и снижения точности детекции. Напротив, КТ обладают узкими спектрами излучения и хорошей устойчивостью к фотообесцвечиванию, характеризуются широким набором перекрывающихся спектральных кодов и высокой чувствительностью многопараметрической детекции. Таким образом, благодаря своим уникальным оптическим характеристикам КТ являются более подходящими флуоресцентными метками для оптического кодирования микросфер [29; 64].

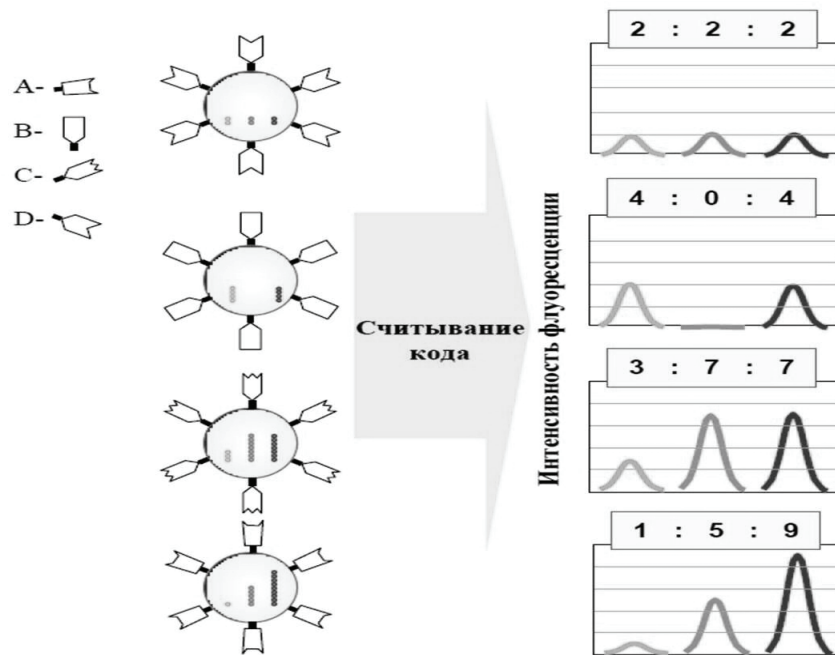
Первые функциональные системы на основе кодированных нанокристаллами микросфер были успешно разработаны для поиска нуклеотидных полиморфизмов и генотипирования. С помощью микросфер, кодированных нанокристаллами, удалось с высокой точностью детектировать 10 разных типов нуклеотидных полиморфизмов в составе амплифицированной геномной ДНК [78]. Eastman и соавт. использовали микросферы, кодированные четырьмя типами КТ в 12 разных концентрационных соотношениях, для анализа экспрессии генов [26]. Точность и чувствительность такого метода детекции были сопоставимы с параметрами анализа на микрочипах. Была продемонстрирована эффективность применения КТ-кодированных микросфер для многопараметрического генетического типирования без предварительной амплификации геномной ДНК в образце [29].

Относительно недавно были продемонстрированы перспективы приложения суспензионных систем на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, в клинической протеомике. А.В. Суханова и И.Р. Набиев с коллегами разработали эффективные суспензионные диагностические системы для определения специфических аутоантител, ассоциированных с развитием аутоиммунных заболеваний [64] (рис. 5). Были также продемонстрированы преимущества использования принципа FRET в суспензионной системе микросфер, кодированных КТ, для достижения высокой чувствительности и точности детекции.

Полная схема определения профиля аутоантител, сопряженных с аутоиммунными заболеваниями, включает несколько основных этапов. Оптически кодированные микросферы конъюгируют с зондом-антигеном, инкубируют с анализом, содержащим специфические аутоантитела, а визуализация и детекция специфического сигнала осуществляется с помощью вторичных антител, меченых референсной флуоресцентной меткой [64]. В описанной работе в качестве модельного аутоиммунного заболевания была выбрана системная склеродермия, прогрессирующее системное заболевание, в основе которого лежит воспалительное поражение мелких сосудов всего организма, с последующими фиброзно-склеротическими изменениями кожи, опорно-двигательного аппарата и внутренних органов. Развитие этого аутоиммунного заболевания ассоциировано с появлением антител против компонентов клеточного ядра, таких как anti-Scl-70, nRNP, anti Smith antigen) и некоторых других аутоантител. В качестве антигенов использовали рекомбинантный фрагмент человеческой ДНК топоизомеразы I (Scl-70), нуклеарный рибонуклеопротеин (nRNP) или Sm-антиген. Такая схема может быть реализована в двух разных форматах оптического декодирования. В одном случае спектральный код микросфер, созданный сочетанием нанокристаллов, и референсный флуоресцентный сигнал детекторных антител фиксируются одновременно, индивидуально и независимо друг от друга (рис. 5).

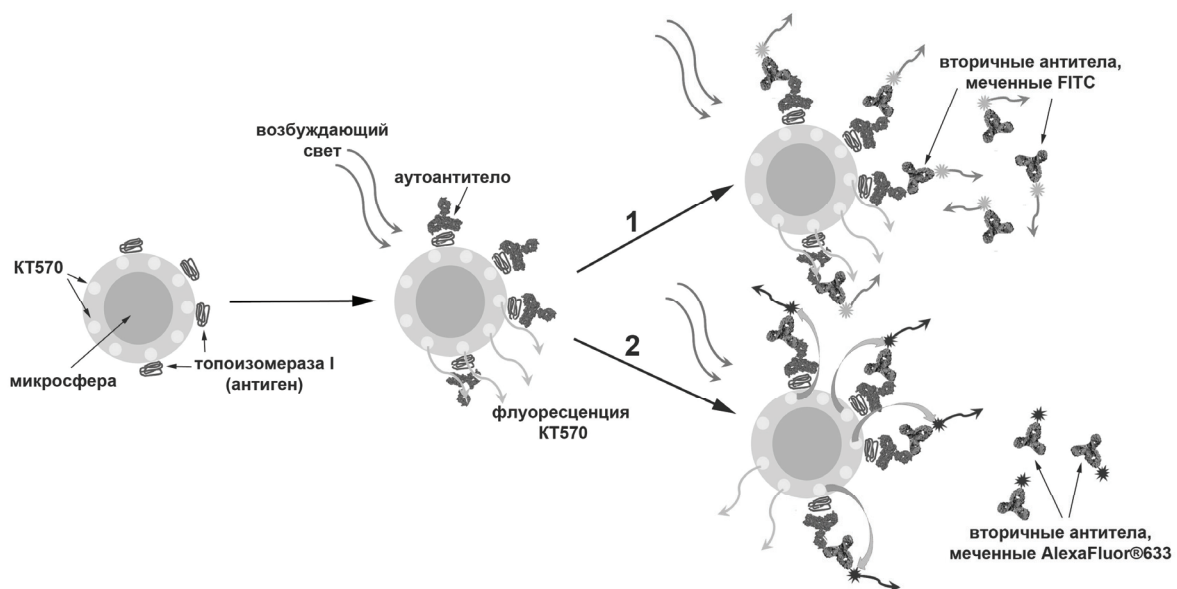
Другой более чувствительный формат детекции анализируемых молекул (аутоантител) предполагает резонансный перенос энергии при возбуждении КТ на референсный краситель, конъюгированный с вторичным детекторным антителом. Преимущество такой схемы переноса энергии заключается в оптимизации индукции флуоресценции нанокристаллов с помощью света одной длины волны и улавливании даже низкого сигнала детекции анализируемых молекул. В составе указанной системы детекции спектры излучения КТ и поглощения референсного красителя AlexaFluor®633 в значительной степени перекрываются.

Благодаря этому свойству при облучении нанокристаллов происходит эффективный перенос энергии их возбуждения на близко расположенные флуоресцентные референсные метки, конъюгированные с вторичными антителами. Значительная удаленность максимумов флуоресценции КТ и органического красителя позволяет дифференцировать два пика излучения энергии, что предоставляет возможность для высокочувствительной детекции [64] (рис. 5). Авторы продемонстрировали, что при селективном возбуждении КТ в составе микросферы одновременно индуцируется флуоресценция оранжевого спектра от нанокристаллов и красного спектра от AlexaFluor®633.



**Рис. 4.** Принципы оптического кодирования, основанные на спектральных свойствах (длине волны поглощения и флуоресценции) и интенсивности флуоресценции нанокристалла:

Крупные сферы представляют собой полимерные микрошарики, в которые в определенном соотношении, количестве и цветовой комбинации включены разноцветные квантовые частицы (маленькие сферы). Поверхность оптически кодированных полимерных микросфер модифицирована биологическими пробами (А-Д) для молекулярного распознавания и связывания с мишенью. Количество цветных сфер отражает уровень интенсивности флуоресценции, а не количество отдельных КТ. Принцип кодирования микросфер определяется и абсолютными значениями интенсивности излучения и отличимыми спектрами флуоресценции разных нанокристаллов. Таким образом, количественные соотношения квантовых точек в составе полимерной микросферы (например, соотношения (2 : 2 : 2) and (4 : 0 : 4)) определяют различия цветового кода микросферы.



**Рис. 5.** Суспензионные аналитические системы на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами. Принцип иммунодетекции аутоантител методом проточной цитометрии:

Оптически кодированные с помощью квантовых точек микросферы конъюгированы с антигеном топоизомераза I, инкубируются с моноклональными антителами к антигену или образцами сыворотки и дополнительно окрашиваются вторичными антителами, мечеными органическим красителем.

А – Вторичные антитела конъюгированы с FITC. Возбуждение и флуоресценция квантовых точек и органического красителя одновременно обеспечивается аргоновым лазером с длиной волны облучения 488 нм.

Б – Вторичные антитела конъюгированы с AlexaFluor@633. Возбуждение квантовых точек обеспечивается светом в диапазоне длин волн 450–500 нм, при близком пространственном расположении покрытых антигеном микросфер и вторичных антител происходит резонансный перенос энергии от квантовых точек и возбуждение флуоресценции органического флуорофора AlexaFluor@633.

При этом не связанные в растворе детекторные антитела, меченые AlexaFluor®633, не выявляют сигнала флуоресценции, поскольку длина волны облучения не попадет в спектральный диапазон возбуждения данного референсного красителя. Таким образом, в составе такой системы КТ поверхностного слоя микросфер могут выступать в качестве эффективных доноров для резонансного переноса энергии и возбуждения красителя AlexaFluor®633 на специфически связанных детекторных антителах [64].

##### 5. Преимущества использования суспензионных систем на основе квантовых точек по сравнению со стандартными диагностическими системами

Качественное выявление опухолевых маркеров уже на ранних стадиях развития заболевания имеет большое значение для выбора эффективных методов лечения и своевременного предотвращения развития онкологии. В настоящее время принципы клинической диагностики рака в основном базируются на двух базовых стратегиях детекции опухолевых маркеров, таких как ИФА и МФСА-технология, разработанная компанией *Luminex*. Однако перечисленные методы обладают серьезными недостатками и ограничениями по сравнению с возможностями многопараметрических суспензионных систем на основе микросфер, кодированных КТ. С помощью ИФА можно одновременно детектировать только один маркер в образце, что делает этот способ анализа профиля онкомаркеров дорогим и затратным по времени. К другим недостаткам технологии анализа с помощью ИФА относятся:

- необходимость в получении больших объемов образцов,
- узкий динамический диапазон,
- сложные стадийные процедуры исполнения [6; 36].

Для МФСА-технологии характерны более широкие диапазоны измерения и детекции анализируемых молекул, гораздо более простая и быстрая техническая подготовка по сравнению с классическим методом ИФА[53]. Тем не менее, разработанная *Luminex* суспензионная система полимерных микросфер, оптически кодированных органическими красителями, требует наличия сложного специального оборудования и насчитывает ограниченное число уникальных спектральных кодов. В то же время, использование флуоресцентных нанокристаллов для кодирования микросфер может значительно усовершенствовать многопараметрические возможности, а также фотостабильность и чувствительность системы [64; 65].

Таким образом, разработка принципов применения в клинической диагностике суспензионных систем на основе микросфер, кодированных нанокристаллами, имеет важное медицинское значение. Возможность многопараметрического анализа профиля онкомаркеров в биологических жидкостях пациентов может значительно способствовать своевременной ранней диагностике и выбору грамотного терапевтического лечения, и как следствие предотвращению развития, метастазирования опухоли, а также развитию новых принципов иммунотерапии.

##### Литература

1. *Anderson K.S., Sibani S., Wallstrom G. et al.* Protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer // *J Proteome Res.* – 2011. – 10. P. 85–96.

##### Заключение

Разработка и успешная интеграция в клинико-диагностическую практику технологий применения квантовых точек и микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, находится на этапе интенсивного исследования и развития. Получены первые интересные результаты применения таких систем для идентификации аутоантител в сыворотке крови пациентов [64] и фенотипирования опухолеспецифических CD8<sup>+</sup> Т-клеток [16; 17]. Эти исследования открывают хорошие перспективы применения разработанных диагностических систем для многопараметрической детекции различных биологических маркеров с очень высокой точностью и чувствительностью. Возможность реализации системы детекции в формате резонансного переноса энергии от возбужденных КТ на специфически связанную референсную метку позволяет в значительной степени нивелировать сигнал неспецифического связывания и повысить чувствительность анализа. С помощью диагностической суспензионной системы микросфер, кодированных КТ, появится возможность детектировать даже малые количества антигенов и специфических аутоантител в крови пациентов.

Это может иметь очень большое значение для своевременной диагностики онкологических заболеваний еще на ранних этапах их развития и применения адекватных эффективных методов терапии рака. Кроме того, идентификация и анализ антиген-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеточных популяций с помощью проточной цитометрии может способствовать пониманию механизмов адаптивного иммунного ответа и разработать подходы для эффективного предотвращения метастазирования опухоли. Детекция редких популяций циркулирующих опухолевых клеток с помощью двухфотонной проточной цитометрии может быть информативной для мониторинга эффективности терапии и прогнозирования метастазирования.

Развитие современных диагностических технологий применения КТ и микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, предоставит новый способ сверхчувствительной ранней диагностики онкологических заболеваний для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

##### Благодарности

*Данная работа частично финансировалась Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках программы привлечения ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования (проф. Игорь Набиев, грант № 11.G34.31.0050, www.lnbe.merphi.ru), а также Европейской Комиссией, через проект Седьмой рамочной программы научного сотрудничества «Нанотехнологические системы для много-модальной диагностики заболеваний и контроля эффективности лечения: Nanotechnological toolkits for multi-modal disease diagnostics and treatment monitoring» (проф. Игорь П. Набиев и Д-р Алена В. Суханова, грант № FP7-NMP-2009-LARGE-3 - 246479 NAMDIATREAM).*

2. Anikeeva N., Lebedeva T., Clapp A.R. et al. Quantum dot/peptide-MHC biosensors reveal strong CD8-dependent cooperation between self and viral antigens that augment the T cell response // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006. – 103. – P. 16846–51.
3. Ballou B., Ernst L.A., Andreko S. et al. Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models // Bioconjug Chem. – 2007. – 18. – P. 389–96.
4. Bei R., Masuelli L., Palumbo C. et al. A common repertoire of autoantibodies is shared by cancer and autoimmune disease patients: Inflammation in their induction and impact on tumor growth // Cancer Lett. – 2009. – 281. – P. 8–23.
5. Bellisario R., Colinas R.J., Pass K.A. Simultaneous measurement of thyroxine and thyrotropin from newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay // Clin Chem. – 2000. – 46. – P. 1422–4.
6. Biagini R.E., Sammons D.L., Smith J.P. et al. Comparison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxins // Clin Diagn Lab Immunol. – 2004. – 11. – P. 50–5.
7. Bodo J., Durkin L., Hsi E.D. Quantitative in situ detection of phosphoproteins in fixed tissues using quantum dot technology // J Histochem Cytochem. – 2009. – 57. – P. 701–8.
8. Brena R.M., Huang T.H., Plass C. Quantitative assessment of DNA methylation: Potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings // J Mol Med (Berl). – 2006. – 84. – P. 365–77.
9. Bruchez M. Jr., Moronne M., Gin P. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels // Science. – 1998. – 281. – P. 2013–6.
10. Caldwell M.L., Moffitt R.A., Liu J. et al. Simple quantification of multiplexed quantum dot staining in clinical tissue samples // Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. – 2008. – P. 1907–10.
11. Caron M., Choquet-Kastylevsky G., Joubert-Caron R. Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery // Mol Cell Proteomics. – 2007. – 6. – P. 1115–22.
12. Caruso F. Nanoeengineering of Particle Surfaces // Adv Mater. – 2001. – 13. – P. 11–22.
13. Casal J.I., Barderas R. Identification of cancer autoantigens in serum: toward diagnostic/prognostic testing? // Mol Diagn Ther. – 2010. – 14. – P. 149–54.
14. Chapman C., Murray A., Chakrabarti J. et al. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis // Ann Oncol. – 2007. – 18. – P. 868–73.
15. Chapman C.J., Thorpe A.J., Murray A. et al. Immunobiomarkers in small cell lung cancer: potential early cancer signals // Clin Cancer Res. – 2011. – 17. – P. 1474–80.
16. Chattopadhyay P.K., Perfetto S.P., Yu J. et al. The use of quantum dot nanocrystals in multicolor flow cytometry // Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. – 2010. – 2. – P. 334–48.
17. Chattopadhyay P.K., Price D.A., Harper T.F. et al. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry // Nat Med. – 2006. – 12. – P. 972–7.
18. Chen C., Peng J., Xia H.S. et al. Quantum dots-based immunofluorescence technology for the quantitative determination of HER2 expression in breast cancer // Biomaterials. – 2009. – 30. – P. 2912–8.
19. Chen H., Xue J., Zhang Y. et al. Comparison of quantum dots immunofluorescence histochemistry and conventional immunohistochemistry for the detection of caveolin-1 and PCNA in the lung cancer tissue microarray // J Mol Histol. – 2009. – 40. – P. 261–8.
20. Cramer D.W., Bast R.C., Jr., Berg C.D. et al. Ovarian cancer biomarker performance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens // Cancer Prev Res (Phila). – 2011. – 4. – P. 365–74.
21. Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J. et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer // N Engl J Med. – 2004. – 351. – P. 781–91.
22. Delehanty J.B., Mattoussi H., Medintz I.L. Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues // Anal Bioanal Chem. – 2009. – 393. – P. 1091–105.
23. Desmetz C., Cortijo C., Mange A. et al. Humoral response to cancer as a tool for biomarker discovery // J Proteomics. – 2009. – 72. – P. 982–8.
24. Desmetz C., Maudelonde T., Mange A. et al. Identifying autoantibody signatures in cancer: a promising challenge // Expert Rev Proteomics. – 2009. – 6. – P. 377–86.
25. Diamandis E.P., Fritsche H.A., Chan D.W. In: Tumor markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications. AACR Press Inc, USA, 2002.
26. Eastman P.S., Ruan W., Doctolero M. et al. Qdot nanobarcodes for multiplexed gene expression analysis // Nano Lett. – 2006. – 6. – P. 1059–64.
27. Finn O.J. Immune response as a biomarker for cancer detection and a lot more // N Engl J Med. – 2005. – 353. – P. 1288–90.
28. Fulton R.J., McDade R.L., Smith P.L. et al. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system // Clin Chem. – 1997. – 43. – P. 1749–56.
29. Gao Y., Stanford W.L., Chan W.C. Quantum-dot-encoded microbeads for multiplexed genetic detection of non-amplified DNA samples // Small. – 2011. – 7. – P. 137–46.
30. Gill R., Freeman R., Xu J.P. et al. Probing biocatalytic transformations with CdSe-ZnS QDs // J Am Chem Soc. – 2006. – 128. – P. 15376–7.
31. Goldman E.R., Medintz I.L., Whitley J.L. et al. A hybrid quantum dot-antibody fragment fluorescence resonance energy transfer-based TNT sensor // J Am Chem Soc. – 2005. – 127. – P. 6744–51.
32. Han M., Gao X., Su J.Z. et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules // Nat Biotechnol. – 2001. – 19. – P. 631–5.
33. Hurley J.D., Engle L.J., Davis J.T. et al. A simple, bead-based approach for multi-SNP molecular haplotyping // Nucleic Acids Res. – 2004. – 32. – P. e186.
34. Jacob F., Goldstein D.R., Bovin N.V. et al. Serum antiglycan antibody detection of nonmucinous ovarian cancers by using a printed glycan array // Int J Cancer. – 2012. – 130. – P. 138–46.
35. Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. FRET imaging // Nat Biotechnol. – 2003. – 21. – P. 1387–95.

36. Jia X.C., Raya R., Zhang L. et al. A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies // *J Immunol Methods*. – 2004. – 288. – P. 91–8.
37. Jimenez L.G., Aguilar M.C., Monroy O.L. et al. Detection of autoantibodies to survivin in cervical mucus from patients with human papillomavirus-associated cervical cancer and precursor lesions // *Autoimmunity*. – 2007. – 40. – P. 66–72.
38. Joumaa N., Lansalot M., Theretz A. et al. Synthesis of quantum dot-tagged submicrometer polystyrene particles by miniemulsion polymerization // *Langmuir*. – 2006. – 22. – P. 1810–6.
39. Kellar K.L., Douglass J.P. Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines // *J Immunol Methods*. – 2003. – 279. – P. 277–85.
40. Kellar K.L., Iannone M.A. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays // *Exp Hematol*. – 2002. – 30. – P. 1227–37.
41. Kim G.B., Kim Y.P. Analysis of protease activity using quantum dots and resonance energy transfer // *Theranostics*. – 2012. – 2. – P. 127–38.
42. Kim S., Lim Y.T., Soltész E.G. et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping // *Nat Biotechnol*. – 2004. – 22. – P. 93–7.
43. Kingeter L.M., Schaefer B.C. Expanding the multicolor capabilities of basic confocal microscopes by employing red and near-infrared quantum dot conjugates // *BMC Biotechnol*. – 2009. – 9. – P. 49.
44. König K. Multiphoton microscopy in life sciences // *J Microsc*. – 2000. – 200. – P. 83–104.
45. Larson D.R., Zipfel W.R., Williams R.M. et al. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo // *Science*. – 2003. – 300. – P. 1434–6.
46. Lee J.S., Lo P.K., Fackler M.J. et al. A comparative study of Korean with Caucasian breast cancer reveals frequency of methylation in multiple genes correlates with breast cancer in young, ER, PR-negative breast cancer in Korean women // *Cancer Biol Ther*. – 2007. – 6. – P. 1114–20.
47. Lukacs Z., Dietrich A., Ganschow R. et al. Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots a feasibility study using a multi-analyte immunoassay // *Clin Chem Lab Med*. – 2005. – 43. – P. 141–5.
48. Medintz I.L., Clapp A.R., Mattoussi H. et al. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors // *Nat Mater*. – 2003. – 2. – P. 630–8.
49. Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing // *Nat Mater*. – 2005. – 4. – P. 435–46.
50. Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A. et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics // *Science*. – 2005. – 307. – P. 538–44.
51. Murphy C.J. Optical sensing with quantum dots // *Anal Chem*. – 2002. – 74. – P. 520A–526A.
52. Ness J.M., Akhtar R.S., Latham C.B. et al. Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection // *J Histochem Cytochem*. – 2003. – 51. – P. 981–7.
53. Nolan J.P., Sklar L.A. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm // *Trends Biotechnol*. – 2002. – 20. – P. 9–12.
54. Pantel K., Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives // *Trends Mol Med*. – 2010. – 16. – P. 398–406.
55. Parungo C.P., Ohnishi S., Kim S.W. et al. Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2005. – 129. – P. 844–50.
56. Perfetto S.P., Chattopadhyay P.K., Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system // *Nat Rev Immunol*. – 2004. – 4. – P. 648–55.
57. Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S. et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels // *Nat Methods*. – 2008. – 5. – P. 763–75.
58. Resnick K.E., Alder H., Hagan J.P. et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform // *Gynecol Oncol*. – 2009. – 112. – P. 55–9.
59. Sheng W., Kim S., Lee J. et al. In-situ encapsulation of quantum dots into polymer microspheres // *Langmuir*. – 2006. – 22. – P. 3782–90.
60. Shi L., Rosenzweig N., Rosenzweig Z. Luminescent quantum dots fluorescence resonance energy transfer-based probes for enzymatic activity and enzyme inhibitors // *Anal Chem*. – 2007. – 79. – P. 208–14.
61. So M.K., Xu C., Loening A.M. et al. Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging // *Nat Biotechnol*. – 2006. – 24. – P. 339–43.
62. Soltész E.G., Kim S., Lawrence R.G. et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots // *Ann Thorac Surg*. – 2005. – 79. – P. 269–77.
63. Stsiapura V., Sukhanova A., Artemyev M. et al. Functionalized nanocrystal-tagged fluorescent polymer beads: synthesis, physicochemical characterization, and immunolabeling application // *Anal Biochem*. – 2004. – 334. – P. 257–65.
64. Sukhanova A., Susha A.S., Bek A. et al. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases // *Nano Lett*. – 2007. – 7. – P. 2322–7.
65. Sun K., Wang Q., Huang X.H. et al. Establishment of multiplexed, microsphere-based flow cytometric assay for multiple human tumor markers // *Acta Pharmacol Sin*. – 2007. – 28. – P. 2011–8.
66. Suzuki H., Graziano D.F., McKolanis J. et al. T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease // *Clin Cancer Res*. – 2005. – 11. – P. 1521–6.
67. Sweeney E., Ward T.H., Gray N. et al. Quantitative multiplexed quantum dot immunohistochemistry // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2008. – 374. – P. 181–6.
68. Tan E.M. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis // *J Clin Invest*. – 2001. – 108. – P. 1411–5.
69. Tan H.T., Low J., Lim S.G. et al. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection // *FEBS J*. – 2009. – 276. – P. 6880–904.
70. Tkaczyk E.R., Zhong C.F., Ye J.Y. et al. In Vivo Monitoring of Multiple Circulating Cell Populations Using Two-photon Flow Cytometry // *Opt Commun*. – 2008. – 281. – P. 888–94.



71. *Voura E.B., Jaiswal J.K., Mattoussi H. et al.* Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy // *Nat Med.* – 2004. – 10. – P. 993–8.
72. *Waggoner A.* Fluorescent labels for proteomics and genomics // *Curr Opin Chem Biol.* – 2006. – 10. – P. 62–6.
73. *Walling M.A., Novak J.A., Shepard J.R.* Quantum dots for live cell and in vivo imaging // *Int J Mol Sci.* – 2009. – 10. – P. 441–91.
74. *Whitehead G.S., Walker J.K., Berman K.G. et al.* Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2003. – 285. – P. L32–42.
75. *Wilson R., Spiller D.G., Prior I.A. et al.* A simple method for preparing spectrally encoded magnetic beads for multiplexed detection // *ACS Nano.* – 2007. – 1. – P. 487–93.
76. *Wu X., Liu H., Liu J. et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots // *Nat Biotechnol.* – 2003. – 21. – P. 41–6.
77. *Xing Y., Smith A.M., Agrawal A. et al.* Molecular profiling of single cancer cells and clinical tissue specimens with semiconductor quantum dots // *Int J Nanomedicine.* – 2006. – 1. – P. 473–81.
78. *Xu H., Sha M.Y., Wong E.Y. et al.* Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – 31. – P. e43.
79. *Yan X., Zhong W., Tang A. et al.* Multiplexed flow cytometric immunoassay for influenza virus detection and differentiation // *Anal Chem.* – 2005. – 77. – P. 7673–8.
80. *Yao H., Zhang Y., Xiao F. et al.* Quantum dot/bioluminescence resonance energy transfer based highly sensitive detection of proteases // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2007. – 46. – P. 4346–9.
81. *Zhang J., Campbell R.E., Ting A.Y. et al.* Creating new fluorescent probes for cell biology // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2002. – 3. – P. 906–18.
82. *Zinkernagel R.M.* What is missing in immunology to understand immunity? // *Nat Immunol.* – 2000. – 1. – P. 181–5.
83. *Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W.* Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences // *Nat Biotechnol.* – 2003. – 21. – P. 1369–77.

### СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

|                    |   |
|--------------------|---|
| anti-Scl-70        | – анти-топоизомераза  |
| anti Smith antigen | – анти-Sm-антиген   |
|                    |   |
| BRET               | – биоломинисцентно резонансный перенос энергии                                  |
| CMV                | – Cytomegalovirus   |
| CLSM               | – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия                                 |
| EBV                | – Epstein–Barr virus  |
| FRET               | – Förster resonance energy transfer (Ферстеровский резонансный перенос энергии) |
| FFPE               | – formalin fixed, paraffin wax embedded   |
| PCNA               | – Proliferating Cell Nuclear Antigen  |
| SNP                | – Single nucleotide polymorphism (одиночные нуклеотидные полиморфизмы)          |
| HIV Nef            | – Human Immunodeficiency Virus Negative regulatory factor                       |
| HIV Gag            | – Human Immunodeficiency Virus Group-specific antigen                           |
| nRNP               | – анти-нуклеарный рибонуклеопротеин   |
| MBP                | – мальтоза-связывающий белок  |

### НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.61-006.6-092:616-031.14

*М.И. Комаров, И.В. Поддубная***ДВУХСТОРОННИЙ РАК ПОЧЕК, ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ**

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

**Контактная информация:***Комаров Максим Игоревич, аспирант кафедры онкологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 23; тел: +7(925)005-00-37**e-mail:** 0050037@mail.ru

Статья поступила 12.04.2013, принята к печати 09.07.2013

**Резюме**

2,6 % всех злокачественных образований у взрослых составляет рак почек, который находится на седьмом месте среди мужчин и на двенадцатом среди женщин. Двухсторонний рак почек составляет около 5 % ото всех случаев рака почки. Наиболее распространенным двухсторонний рак почки считается при синдроме фон Хиппель-Линдау и других семейных формах рака почки.

**Ключевые слова:** рак почки, двухсторонний рак почек, первично-множественные злокачественные новообразования.

*M.I. Komarov, I.V. Poddubnaya***BILATERAL RENAL CELL CANCER ETIOLOGY AND PATHOGENESIS**

FBSI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

**Abstract**

Renal cell cancer takes 2,6 % of all malignance neoplasms of adults and on prevalence is on the seventh place among men and on the twelfth among women. The bilateral renal cell cancer makes about 5% from all cases of kidney cancer. The bilateral kidney cancer is considered the most widespread at von Hippel-Lindau's syndrome and other family forms of a kidney cancer.

**Key words:** cancer of the kidney, bilateral renal cancer, multiple primary cancer.

**Эпидемиология рака почки, смертность**

Одной из основных проблем онкоурологии являются злокачественные опухоли почек. Рак почек составляет 2,6% всех злокачественных образований у взрослых и по распространенности находится на седьмом месте среди мужчин и на двенадцатом среди женщин. В 2012 году в США были выявлены 65000 новых случаев рака почки, смертность составила 13,500 [19]. На долю почечноклеточного рака приходится 85% всех злокачественных новообразований почки [28]. Заболеваемость в странах Европы колеблется от 4,4 до 11,1 на 100 000 населения.

Риск развития рака почки существенно возрастает, начиная с возраста 40 лет, и достигает своего пика к 70 годам, причем мужчины заболевают в 3 раза чаще, чем женщины и имеют более низкий процент выживаемости [3; 6; 15; 61].

В 2010 году в России зарегистрировано 18723 новых больных раком почки. По сравнению с 2005 г. прирост абсолютного числа заболевших составил 17,2% у мужчин и 21,3% у женщин. В структуре смертности рак почки среди мужчин составляет 3,4 %, среди женщин – 2,4 % [2].

Несмотря на успехи развития лучевых методов диагностики, позволившие повысить выявляемость рака почки на ранних стадиях в качестве случайной находки в рамках рутинного исследования и приведшие к увеличению 5-летней выживаемости пациентов, с 1980 г. наблюдается рост выявляемости заболевания на поздних стадиях, что некоторые авторы связывают с изменением влияния окружающей среды, включающем алиментарный фактор, курение и воздействие различных канцерогенов [14; 42; 50; 52].

**Распространенность двухстороннего рака почек**

В мировой литературе представлено множество работ, в которых доказан риск развития контралатерального поражения парных органов: глаз, молочных желез, яичек, однако мало изученными являются двусторонние онкологические процессы в яичниках, легких, и почках [4; 5]. Двухсторонний рак почек разделяют на синхронный (выявляемый одновременно) и метасинхронный (выявляемый в противоположной почке через 6 и более месяцев). Различают наследственный (светлоклеточный почечноклеточный рак; рак почки при синдроме фон Хиппель-Линдау; наследственная папиллярная карцинома почки) и ненаследственный (спорадический) двухсторонний рак почек. Среди случаев спорадического рака почки от 2 % до 4 % включают развитие двухстороннего поражения. В урологической клинике ММА им. И.М. Сеченова в период с 1973 по 2006 гг., наблюдались 1430 пациентов с новообразованиями почек, двухсторонние опухоли обнаружены у 8,2 % , при этом у 5,7 % пациентов диагностирован двухсторонний рак почек [1]. По данным Glen W. и соавт. (2011) двухсторонний рак почек составляет 5 % всех случаев рака почки [21]. Среди 81 больного двухсторонним раком почек синхронный процесс имел место у 51 (62,96 %), что составило 3,6 % общего числа больных опухолью почки (34 мужчины и 17 женщин) [1]. У больных двухсторонним раком почек преобладает мультифокальный характер поражения. Так, по данным Klatte T. и соавт. (2007) у 54 % больных были выявлены 2 и более очагов опухолевого роста в почках [32]. С другой стороны, в работе Wunderlich H. et al. (1999) показано, что у 90 % пациентов с мультифокальным раком почек отмечается двухстороннее поражение [70].

В крупном популяционном эпидемиологическом исследовании, проведенном Wiklund F. и соавт. (2009) было показано, что вероятность диагностирования двустороннего метахронного рака почек значительно выше в случае выявления онкологического процесса в одной почке в раннем возрасте, и эта вероятность значительно увеличивается с течением времени наблюдения [69].

#### Этиология рака почки

Традиционно считается, что источником для развития рака почки являются клетки проксимальных извитых канальцев, и это подтверждено для подавляющего большинства светлоклеточных и папиллярных вариантов опухолей.

Однако в последнее время в мировой литературе появились исследования, в которых содержатся данные о происхождении хромофобных опухолей, а также почечноклеточного рака собирательных трубочек из более дистально расположенных компонентов нефрона [49; 51; 62]. Общепризнанным фактором риска развития рака почки является употребление табака, что характеризуется величинами относительного риска от 1,4 до 2,5.

При этом нарастание риска отмечается с увеличением кумулятивной дозы никотина, либо стажа курения [18; 36]. Для женщин курение, как фактор риска развития рака почки, имеет меньшее значение, чем для мужчин [43]. Другими факторами риска развития рака почки являются ожирение, артериальная гипертензия, использование диуретических препаратов, терминальная стадия ХПН, сахарный диабет [41].

Хотя на животных моделях были показаны многочисленные потенциальные этиологические факторы развития рака почки (вирусы, тяжелые металлы, химические вещества, в частности, ароматические соединения), статистически доказанного фактора на пациентах получено не было [9; 30]. Наиболее популярными были исследования возможной роли воздействия трихлорэтилена, и в отдельных работах был показан прирост относительного риска развития рака почки от 2,0 до 6,0 [12; 22; 27; 40; 44; 66].

Vrauch H. и соавт. (1999) в своей работе пришли к выводу о накоплении мутаций в гене фон Хиппель-Линдау (VHL) в исследуемой популяции, в которой выше была частота контактов с трихлорэтиленом [11].

Некоторое повышение относительного риска развития почечноклеточного рака отмечено у работников металлургических предприятий, производств с обработкой изделий из резины, химической промышленности, печатных производств, а также при контакте с асбестом и кадмием [18; 33; 36; 45; 55].

В одной работе содержатся данные об увеличении риска развития почечноклеточного рака в 13,1 раз у работников предприятий, связанных с производством витаминов А и Е [56].

#### Патогенез рака почки и двухстороннего рака почек

С начала 1990-х гг. в мировой литературе стали появляться работы, в которых исследовались молекулярно-генетические аспекты патогенеза рака почки. Были открыты генетические синдромы, ассоциированные с развитием как семейных, так и спорадических форм рака почки, выделены соответствующие онкогены и гены опухолевой супрессии (табл.).

Таблица

#### Формы семейного рака почки

| Синдром                        | Генотип                                  |
|--------------------------------|--|
| Фон Хиппель-Линдау             | Ген VHL<br>(хромосома 3p25-26)           |
| Наследственный папиллярный ПКР | c-met протоонкоген<br>(хромосома 7q34)   |
| Семейный лейомиоматоз с ПКР    | Фумарат-гидратаза<br>(хромосома 1q42-43) |
| Бирт-Хогг-Дьюба                | Ген BHD1<br>(хромосома 17p12)            |
| Туберозный склероз             | TSC1, TSC2                               |
| РП, ассоциированный с SDHB     | SDHB                                     |

В 1972 г. было выдвинуто предположение, что семейные формы рака почки со свойственным им мультифокальным ростом развиваются в связи с распространностью мутаций в одном аллеле гена, тогда как спорадические формы возникают при мутациях, поражающих оба аллеля одного гена, что может произойти в течение жизни (чем обуславливается возраст, в котором заболеваемость раком почки наиболее высока) в отдельной взятой клетке почечной ткани (что определяет, как правило, монофокальный характер процесса) со сравнительно небольшой вероятностью. Это утверждение впоследствии было подтверждено в работах многих авторов [11; 16; 37; 53; 54; 73].

Наиболее распространенным двухсторонним раком почки считается при синдроме фон Хиппель-Линдау и других семейных формах рака почки. Синдром фон Хиппель-Линдау – это относительно редко встречаемое аутосомно-доминантное генетическое заболевание, распространенность которого в популяции составляет 1 на 36 000 населения. Основными проявлениями болезни фон Хиппель-Линдау являются развитие почечно-клеточных карцином, феохромоцитом, ангиом почек, а также гемангиобластом ствола мозга, мозжечка и спинного мозга [24; 26; 29; 34; 39; 46]. Особенностью опухолей при данном заболевании является тенденция к высокой степени васкуляризации, что обуславливает агрессивность течения процесса. Почечно-клеточный рак встречается у 50 % пациентов с болезнью фон Хиппель-Линдау, при этом наиболее частым является его дебют в возрасте 20–50 лет, а также двухсторонний и/или мультифокальный характер [24; 26; 29; 34; 39; 46]. В связи с совершенствованием методов лечения опухолей центральной нервной системы, ассоциированных с болезнью фон Хиппель-Линдау, на данный момент основной причиной смерти таких больных является прогрессирование почечно-клеточного рака [39; 46].

Патогенез синдрома фон Хиппель-Линдау включает мутацию (инактивацию) гена VHL, продуктом которого является белок, связывающийся с гипоксия-индуцированным фактором роста-1 (HIF-1) и последующее убиквитинилирование образовавшегося комплекса, за счет чего в клетках поддерживается адекватный уровень HIF-1. При повреждении гена VHL убиквитинилирование HIF-1 не происходит, и он начинает накапливаться в клетках, активируя экспрессию VEGF – эндотелиального сосудистого фактора роста (VEGF – основной фактор опухолевой прогрессии ПКР), переносчика глюкозы Glut1 и тромбоцитарного фактора роста (PDGF). Соответственно, при этом стимулируются процессы ангиогенеза, насыщения цитоплазмы глюкозой и выработки аутокринных факторов роста [23; 38; 65; 68; 72]. При синдроме наслед-

ственной папиллярной карциномы почки высок риск развития двухстороннего папиллярного рака почки типа 1. Причиной этого синдрома является мутация в протоонкогене *c-met* [58; 59; 72].

Пациенты с синдромом Бирт-Хогг-Дьюба имеют предрасположенность к возникновению двухстороннего мультифокального хромофобного рака почек. Наряду с этим могут развиваться доброкачественные опухоли кожи, фиброфолликуломы, а также часто встречаются легочные кисты и рецидивирующий пневмоторакс. В этиологии синдрома Бирт-Хогг-Дьюба лежит мутация гена *VHD* [10; 31; 48; 60; 72].

Для опухолей почек, ассоциированных с болезнью фон Хиппель-Линдау, синдромом Бирт-Хогг-Дьюба, а также для наследственных папиллярных карцином рекомендована тактика наблюдения при обнаружении образований размером менее 3 см [53]. При туберозном склерозе, наряду с ангиомиолипомами, светлоклеточными карциномами и онкоцитомами почек встречаются также поражения кожи, гамартумы центральной нервной системы и легочные кисты. Более редкими являются хромофобные и папиллярные опухоли почек [13; 17]. Другим генетическим синдромом, для которого характерно двухстороннее опухолевое поражение почек является семейный лейомиоматоз. В основе патогенеза лейомиоматоза лежит дефект фермента фумарат гидратазы. Морфологически эти опухоли отличаются от опухолей, описанных при вышеназванных генетических синдромах, и представляют собой папиллярные карциномы типа 2 или опухоли, происходящие из эпителия собирательных трубочек. Особенностью данного злокачественного процесса является тенденция к массивному лимфогенному и гематогенному метастазированию при размерах первичной опухоли менее 1 см. [20; 25; 35; 44; 63; 64]. При синдроме семейной феохромоцитомы/параганглиомы (PGL – синдром), связанном с дефектом еще одного фермента цикла Кребса – сукцинат дегидрогеназы, также часто встречаются различные морфологические варианты двухстороннего мультифокального рака почек [7; 8; 47; 57; 67]. Эти данные подчеркивают необходимость понимания генетического базиса, лежащего в основе

двухстороннего рака почек, так как различные генетические варианты могут оказывать значительное влияние на тактику лечения и прогноз [37]. В то же время можно отметить, что при двухстороннем процессе могут присутствовать клетки различной степени дифференцировки, которая, очевидно, не полностью детерминируется генетическими факторами. При анализе морфологической структуры двухстороннего синхронного и асинхронного рака почек у больных может быть выявлен идентичный гистологический тип опухоли, развивающийся при мутациях определенных типов. С другой стороны, если исходить из обратного и допустить метастатическую природу опухоли в одной из почек, было бы логичным предполагать наличие отдаленных метастазов и другой локализации, которые наблюдаются у этих больных достаточно редко, в основном – при генерализации процесса.

Таким образом, на основании данных мировой литературы, двухсторонний РП (синхронный и метастатический) является генетически детерминированным первично билатеральным опухолевым процессом, который может манифестировать либо одновременно (синхронно), либо через определенный (нередко значительный) временной промежуток (метахронно). По данным Ю.А. Аляева и З.Г. Григоряна (2008), в подавляющем большинстве наблюдений (за исключением редких случаев генерализации процесса) опухоли в обеих почках являются самостоятельными (неметастатическими) образованиями, в отношении которых непременно должно применяться раздельное стадирование опухолевого процесса по классификации TNM [2]. При этом, при наличии отдаленных метастазов символ  $M_1$  должен фигурировать при стадировании обеих опухолей.

### Заключение

Суммируя вышесказанное, следует подчеркнуть актуальность проблемы, которой посвящено данное исследование. Изучение этиопатогенетических факторов позволит оптимизировать диагностическую и лечебную тактику при двухстороннем раке почек, что в настоящее время является одним из важных вопросов онкоурологии.

### Литература

1. Аляев Ю.Г., Григорян З.Г., Левко А.А. Опухоль почки в сочетании с поражением противоположной неонкологическим заболеванием // Онкоурология. 2008. - №2 - С. 8-16
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2010 г. // М, Издательская группа РОНЦ, 2012
3. Лопаткин Н.А. Урология: национальное руководство. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 1024 с.
4. Матвеев В.Б. Хирургическое лечение двустороннего рака почек. В кн.: Клиническая онкоурология. Под ред. Б.П. Матвеева. – М.: Вердана, 2003. – С. 158–62.
5. Трапезникова М.Ф. Опухоли почек. – М.: Медицина, 1978. – 183 с.
6. Aron M., Nguyen M.M., Stein R.J., Gill I.S. Impact of gender in renal cell carcinoma: an analysis of the SEER database // Eur Urol. – 2008. – 54(1). – P. 133–40.
7. Baysal B.E. Clinical and molecular progress in hereditary paraganglioma // J Med Genet. – 2008. – 45. – P. 689–94.
8. Baysal B.E., Ferrell R.E., Willett-Brozick J.E. et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma // Science. – 2000. – 287. – P. 848–51.
9. Bennington J.L., Beckwith J.B. Tumors of the Kidney, Renal Pelvis, and Ureter. Atlas of Tumor Pathology, 2nd Series, Fascicle 12, Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1947.
10. Birt A.R., Hogg G.R., Dube W.J. Hereditary multiple fibrofolliculomas with trichodiscomas and acrochordons // Arch Dermatol. – 1977. – 113. – P. 1674–7.
11. Brauch H., Weirich G., Hornauer M.A. et al. Trichloroethylene exposure and specific somatic mutations in patients with renal cell carcinoma // J Natl Cancer Inst. – 1999. – 91. – P. 854–61.
12. Bruning T., Pesch B., Wiesenhutter B. et al. Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: Results of a consecutive case-control study in Arnsberg, Germany // Am J Ind Med. – 2003. – 43. – P. 274–85.
13. Cheadle J.P., Reeve M.P., Sampson J.R. et al. Molecular genetic advances in tuberous sclerosis // Hum Genet. – 2000. – 107. – P. 97–114.
14. Chow W.H., Devesa S.S., Fraumeni J.F. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. – Genitourinary Oncology – 2nd ed. Edited by N.J. Vogelzang, P.T. Scardino, W.U. Shipley, D.S. Coffey – USA: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. – P. 101–10.
15. Chow W.H., Devesa S.S., Warren J.L., Fraumeni J.F. Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States // JAMA. – 1999. – 281(17). – P. 1628–31.
16. Choyke P.L., Glenn G.M., Walther M.M. et al. Hereditary renal cancers // Radiology. – 2003. – 226. – P. 33–46.
17. Crino P.B., Nathanson K.L., Henske E.P. The tuberous sclerosis complex // N Engl J Med. – 2006. – 355. – P. 1345–56.
18. Dhote R., Thiounn N., Debre B. et al. Risk factors for adult renal cell carcinoma // Urol Clin North Am. – 2004. – 31. – P. 237–47.

19. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. // CA Cancer J Clin. 2012;62:10–29.
20. Foley D.P. Long-term outcomes of kidney transplantation in recipients 60 years of age and older at the University of Florida // Clin. Transpl. – 2005. – P. 101–9.
21. Glen W, Barrisford, Eric A, Singer, Inger L, Rosner et al. Familial Renal Cancer: Molecular Genetics and Surgical Management // Int J Surg Oncol. – 2011. – 658767. – Published online 2011 August.
22. Gohji K. Multifocal renal cell carcinoma in Japanese patients with tumors with maximal diameters of 50 mm. or less // J. Urol. – 1998. – 159. – P. 1144–7.
23. Grabmaier K., A de Weijert M.C., Verhaegh G.W. et al. Strict regulation of CAIX (G250/MN) by HIF-1 alpha in clear cell renal cell carcinoma // Oncogene. – 2004. – 23. – P. 5624–31.
24. Green J.S. von Hippel–Lindau disease in a Newfoundland kindred // Can Med Assoc J. – 1986. – 134. – P. 133–8.
25. Grubb R.L. III, Franks M.E., Toro J. et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: A syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer // J Urol. – 2007. – 177. – P. 2074–80.
26. Horton W.A., Wong V., Eldridge R. von Hippel–Lindau disease: Clinical and pathological manifestations in nine families with 50 affected members // Arch Intern Med. – 1976. – 136. – P. 769–77.
27. Hu J., Mao Y., White K. Renal cell carcinoma and occupational exposure to chemicals in Canada // Occup Med. – 2002. – 52. – P. 157–64.
28. Jemal A., Siegel R., Ward E. et al. Cancer statistics, 2006 // A cancer Journal for Clinicians. – 2006. – 56(2). – P. 106–30.
29. Jennings A.M., Smith C., Cole R. et al. von Hippel–Lindau disease in a large British family: Clinicopathological features and recommendations for screening and follow-up // Q J Med. – 1988. – 66. – P. 233–49.
30. Kantor A.F. Current concepts in the epidemiology and etiology of primary renal cell carcinoma // J Urol. – 1977. – 117. – P. 415–7.
31. Kasiske B.L. The evaluation of renal transplantation candidates: clinical practice guidelines // Am. J. Transplant. – 2001. – 1(Suppl 2). – P. 3–95.
32. Klatter T., Wunderlich H., Patard J.J. et al. Clinicopathological features and prognosis of synchronous bilateral renal cell carcinoma: an international multicentre experience // BJU. Int. – 2007. – 100. – P. 21–5.
33. Kolonel L.N. Association of cadmium with renal cancer // Cancer. – 1976. – 37. – P. 1782–7.
34. Lamiell J.M., Salazar F.G., Hsia E. von Hippel–Lindau disease affecting 43 members of a single kindred // Medicine (Baltimore). – 1989. – 68. – P. 1–29.
35. Launonen V., Vierimaa O., Kiuru M. et al. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2001. – 98. – P. 3387–92.
36. Lindblad P. Epidemiology of renal cell carcinoma // Scand J Surg. – 2004. – 93. – P. 88–96.
37. Linehan W.M. Genetic Basis of Bilateral Renal Cancer: Implications for Evaluation and Management // Journal of Clinical Oncology. – 2009. – 27(23). – P. 3731–3.
38. Linehan W.M. Kidney cancer—a unique opportunity for the development of disease specific therapy [editorial] // J Urol. – 2002. – 168. – P. 2411–2.
39. Maher E.R., Kaelin Jr W.G. von Hippel–Lindau disease // Medicine (Baltimore). – 1997. – 76. – P. 381.
40. Mandel J.S. Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethylene // J Cancer Res Clin Oncol. – 2001. – 127. – P. 265–6.
41. Maranchie J.K., Linehan W.M. Genetic disorders and renal cell carcinoma // Urol Clin North Am. – 2003. – 30. – P. 133–41.
42. Mathew A., Devasa S.S., Fraumeni J.F., Chow W.H. Global increases in kidney cancer incidence, 1973–1992 // Eur J Cancer Prev. – 2002. – 11(2). – P. 171–8.
43. McLaughlin J.K., Lindblad P., Mellegaard A. et al. International renal cell cancer study: I. Tobacco use // Int J Cancer. – 1995. – 60. – P. 94–198.
44. Merino M.J., Torres-Cabala C., Pinto P. et al. The morphologic spectrum of kidney tumors in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) syndrome // Am J Surg Pathol. – 2007. – 31. – P. 1578–85.
45. Moyad M.A. Review of potential risk factors for kidney (renal cell) cancer // Semin Urol Oncol. – 2001. – 19. – P. 280–93.
46. Neumann H.P., Pawlu C., Peczkowska M. et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations // JAMA. – 2004. – 292. – P. 943–951.
47. Neumann H.P., Zbar B. Renal cysts, renal cancer, and von Hippel–Lindau disease // Kidney Int. – 1997. – 51. – P. 16–26.
48. Nickerson M.L., Warren M.B., Toro J.R. et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome // Cancer Cell. – 2002. – 2. – P. 157–64.
49. Oyasu R. Renal cancer: Histologic classification update // Int J Clin Oncol. – 1998. – 3. – P. 125–33.
50. Pantuck A.J., Zisman A., Belldgrun A. Biology of renal cell carcinoma: Changing concepts in classification and staging // Semin Urol Oncol. – 2001. – 19. – P. 72–9.
51. Pantuck A.J., Zisman A., Belldgrun A.S. The changing natural history of renal cell carcinoma // J Urol. – 2001. – 166. – P. 1611–23.
52. Parsons J.K., Schoenberg M.S., Carter H.B. Incidental renal tumors: Casting doubt on the efficacy of early intervention // Urology. – 2001. – 57. – P. 1013–5.
53. Pavlovich C.P., Grubb R.L., Hurley K. et al. Evaluation and management of renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome // J Urol. – 2005. – 173. – P. 1482–6.
54. Pavlovich C.P., Schmidt L.S., Phillips J.L. The genetic basis of renal cell carcinoma // Urol Clin North Am. – 2003. – 30. – P. 437–54.
55. Pesch B., Haerting J., Ranfi U. et al. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: Agent-specific results from a case-control study in Germany // Int J Epidemiol. – 2000. – 29. – P. 1014–24.
56. Richard S., Carrete M.N., Beroud C. et al. High incidence of renal tumours in vitamins A and E synthesis workers: A new cause of occupational cancer? // Int J Cancer. – 2004. – 108. – P. 942–4.
57. Ricketts C., Woodward E.R., Killick P. et al. Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma // J Natl Cancer Inst. – 2008. – 100. – P. 1260–2.
58. Schmidt L., Duh F.M., Chen F. et al. Germline and somatic mutations in tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas // Nat Genet. 1997. – 16. – P. 68–73.
59. Schmidt L., Junker K., Weirich G. et al. Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene // Cancer Res. – 1998. – 58. – P. 1719–22.
60. Schmidt L.S., Nickerson M.L., Warren M.B. et al. Germline BHD-mutation spectrum and phenotype analysis of a large cohort of families with Birt-Hogg-Dube syndrome // Am J Hum Genet. – 2005. – 76. – P. 1023–33.
61. Stafford H.S., Saltzstein S.L., Shimasaki S. et al. Racial/ethnic and gender disparities in renal cell carcinoma incidence and survival // J Urol. – 2008. – 179(5). – P. 1704–8.
62. Styrkel S. Classification of renal cancer: Correlation of morphology and cytogenetics. In: Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, Coffey DS, ed. Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology, 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. – P. 179–86.
63. Tomlinson I.P., Alam N.A., Rowan A.J. et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer // Nat Genet. – 2002. – 30. – P. 406–10.
64. Toro J.R., Nickerson M.L., Wei M.H. et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America // Am J Hum Genet. – 2003. – 73. – P. 95–106.
65. Turner K.J., Moore J.W., Jones A. et al. Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: Relationship to angiogenesis and to the von Hippel–Lindau gene mutation // Cancer Res. – 2002. – 62. – P. 2957–61.
66. Vamvakas S., Bruning T., Bolt H.M. et al. Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethylene // J Cancer Res Clin Oncol. – 2000. – 126. – P. 178–80.
67. Vanharanta S., Buchta M., McWhinney S.R. et al. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma // Am J Hum Genet. – 2004. – 74. – P. 153–9.
68. Wiesener M.S., Seyfarth M., Warnecke C. et al. Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel–Lindau gene in a renal cell carcinoma // Blood. – 2002. – 99. – P. 3562–5.
69. Wiklund F., Tretli S., Choueiri T.K. et al. Risk of bilateral renal cell cancer // J Clin Oncol. – 2009. – 27(23). – P. 3737–41. Epub 2009 Jul 13.
70. Wunderlich H., Schlichter A., Zermann D. et al. Multifocality in renal cell carcinoma: A bilateral event? // Urol. Int. – 1999. – 63. – P. 160–3.
71. Wykoff C.C., Beasley N.J., Watson P.H. et al. Hypoxia-inducible expression to tumor-associated carbonic anhydrases // Cancer Res. – 2000. – 60. – P. 7075–83.
72. Zbar B., Alvord W.G., Glenn G.M. et al. Risk of renal and colonic neoplasms and spontaneous pneumothorax in the Birt-Hogg-Dube syndrome // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2002. – 11. – P. 393–400.
73. Zimmer M., Iliopoulos O. Molecular genetics of kidney cancer // Cancer Treat Res. – 2003. – 116. – P. 3–27.

## СПИСОК ИСПОЛЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

SDHB

– сукцинат дегидрогеназой В;

ХПН

– хроническая почечная недостаточность

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-006.448:576.385.5:577.175.722

*С.С. Шушанов, Т.А. Кравцова, Ю.Б. Черных***ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 ТИПА (IGF-1) НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

ФГБУ «РОИЦ им.Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

**Контактная информация**

Шушанов Саин Сакенович, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(962)939-82-55

e-mail: [sainHersh@yandex.ru](mailto:sainHersh@yandex.ru)

Статья поступила 18.03.2013, принята к печати 09.07.2013

**Резюме**

В работе было исследовано влияние экзогенного инсулиноподобного фактора роста 1 типа на выживаемость и рост трех линий клеток множественной миеломы человека: RPMI1640, RPMI8226 и IM9. В указанных линиях клеток также была исследована роль IGF-1 в регуляции экспрессии мРНК генов, участвующих в апоптозе. Данные, полученные методом МТТ-теста, подсчета и исследования кривых выживаемости клеток показали, что IGF-1 усиливает выживаемость и рост клеток RPMI1640 и IM-9, и не влияет на выживаемость и рост клеток RPMI8226. В ходе исследований, с использованием метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, было установлено, что экспрессия мРНК генов: *Bcl-2*, *Mcl-1* и *HIAP-1* является IGF-1/IGF-1R зависимой, в то время как экспрессия мРНК генов *Bcl-xL*, *HIAP-2*, *NAIP*, *CycB1*, *CycD1* не зависит от активации IGF-1/IGF-1R сигнального пути.

**Ключевые слова:** инсулиноподобный фактор роста 1-го типа (IGF-1), выживаемость, экспрессия мРНК, множественная миелома.

*S.S. Shushanov, T.A. Kravcova, U.B. Chernych***EFFECT OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR TYPE-1 (IGF-1) ON MULTIPLE MYELOMA CELL SURVIVAL**

FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

**Abstract**

In this paper investigated the effect of exogenous insulin-like growth factor type -1 on the survival and growth of three cell lines of human multiple myeloma (MM): RPMI1640, RPMI8226 and IM9. In these cell lines was also investigated the role of IGF-1 in the regulation of mRNA expression of genes involved in apoptosis. The data obtained by the MTT-test, counting and cell survival curves studies have shown that IGF-1 enhances the survival and growth of RPMI1640 and IM-9 cells, and has no effect on the survival and growth of RPMI8226 cells. It was found, using RT-PCR, that the mRNA expression of genes: *Bcl-2*, *Mcl-1* and *HIAP-1* is IGF-1/IGF-1R dependent, while the mRNA expression of *Bcl-xL*, *HIAP-2*, *NAIP*, *CycB1*, *CycD1* independent of IGF-1/IGF-1R activation pathway.

**Key words:** multiple myeloma, insulin-like growth factor type-1 (IGF-1), survival, mRNA expression.

**Введение**

Множественная миелома – злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и/или моче и остеолитическими поражениями костей [1]. В соответствии с классификацией ВОЗ ММ относится к периферическим В-клеточным лимфоидным опухолям [14]. ММ составляет 1% от всех онкологических заболеваний и 13% от всех гемобластозов (неопластических заболеваний кровяной и лимфатической ткани) [23]. Причины развития ММ у человека остаются неясными. Одним из злокачественных свойств клеток ММ является их способность мигрировать и локализоваться в костном мозге [1; 2]. В микроокружении костного мозга клетки ММ взаимодействуют с клетками стромы

костного мозга и активирует в них транскрипцию и секрецию различных цитокинов и факторов роста: IL-6 (интерлейкин-6), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), TNF $\alpha$  (фактор некроза опухоли альфа), TGF $\beta$  (трансформирующий фактор роста бета), SDF-1 $\alpha$  (фактор стромальных клеток 1 $\alpha$ ), IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1 типа) и другие цитокины и факторы роста [12; 30]. Воздействие этих факторов на миеломные клетки может придать им более агрессивные свойства – усилить пролиферацию, выживаемость, миграцию, а также может активировать механизмы возникновения лекарственной устойчивости и активировать разрушения кости. Поэтому исследование роли цитокинов и факторов роста в злокачественной прогрессии ММ является на сегодня одним из актуальных направлений в экспериментальной онкологии и этому посвящено немало работ. Среди публикаций имеется работа, в которой исследовалось влияние на выжи-

ваемость CD<sup>45+</sup> и CD<sup>45-</sup> миеломных клеток комбинации нескольких факторов роста: IL-6, IGF-1, HGF (фактор роста гепатоцитов), HB-EGF (эпидермальный фактор роста, связывающий гепарин), APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию). В этой работе было показано, что одним из важных факторов выживания для клеток ММ является IGF-1 [30].

IGF-1 оказывает свой биологический эффект через связывание и активацию его рецептора IGF-1R, который является рецепторной тирозин киназой, гетеротетрамером, состоящим из двух внеклеточных  $\alpha$ -субъединиц, связывающихся с IGF-1, и двух внутриклеточных  $\beta$ -субъединиц, содержащих тирозин киназный домен. Связывание IGF-1 с IGF-1R приводит к активации внутренней тирозин киназы IGF-1R и последующему аутофосфорилированию тирозинов внутриклеточной  $\beta$ -субъединицы, включая около-мембранный тирозин в положении 950 [25]. Этот тирозин служит сайтом связывания для субстратов IGF-1R, которые после связывания и последующего фосфорилирования, инициируют передачу сигналов от IGF-1R внутрь клетки посредством активирования целого ряда нижележащих эффекторов [11]. Установлено, что в микроокружении костного мозга клетки ММ при взаимодействии с эндотелием кровеносных сосудов экспрессируют на своей поверхности IGF-1R [19].

Увеличение количества IGF-1R на поверхности клеток ММ приводит к большему числу IGF-1/IGF-1R взаимодействий и последующей активации нижележащих сигнальных путей в клетке, которые могут усилить злокачественные свойства миеломных клеток – пролиферацию, миграцию, выживаемость.

Известно, что в злокачественной прогрессии миеломных клеток участвуют гены семейства Bcl-2 и гены семейства ингибиторов апоптоза IAP. Показано, что высокий уровень экспрессии некоторых генов из этих семейств ассоциируется с малигнизированным фенотипом миеломных клеток [29], с их лекарственной устойчивостью к доксорубину, дексаметазону и этопозиду [10; 33; 34], а также с увеличением их выживаемости [4]. Исследования показали, что в регуляции экспрессии генов семейства Bcl-2 и IAP может участвовать IGF-1/IGF-1R-опосредуемый сигнальный путь. Однако имеющиеся в литературе данные являются противоречивыми, и исследования в этом направлении в настоящее время продолжаются.

В своей работе мы исследовали роль экзогенного IGF-1 в выживании трех линий клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226 и IM9, а также исследовали роль IGF-1/IGF-1R-опосредуемой регуляции экспрессии мРНК генов, участвующих в апоптозе: *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl-1*, *HIAP-1*, *HIAP-2*, *survivin*, *NAIP*.

### Материалы и методы

#### Линии клеток множественной миеломы

В работе использованы три типа суспензионных линий клеток множественной миеломы человека, экспрессирующих на своей поверхности указанные в скобках маркеры дифференцировки: RPMI1640 (CD<sup>138+</sup>, CD<sup>38+</sup>, CD<sup>45-</sup>, CD<sup>56±</sup>, CD<sup>19-</sup>), RPMI8226 (CD<sup>138+</sup>, CD<sup>38+</sup>, CD<sup>45-</sup>, CD<sup>56±</sup>, CD<sup>19-</sup>), IM9 (CD<sup>138+</sup>, CD<sup>38+</sup>, CD<sup>45+</sup>, CD<sup>56-</sup>, CD<sup>19+</sup>) [16]. Происхождение указанных линий клеток: человек, костный мозг, миелома. Способ культивирования: суспензионный в среде RPMI-1640 с 10%-ной ТЭС при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>.

#### Оценка выживаемости клеток ММ колориметрическим методом (МТТ)

Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток превращать «желтый» МТТ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид в «синий» формазан. Клетки засевали в 96-луночные планшеты по  $2 \times 10^4$  клеток на лунку в 150 мкл среды без сыворотки и без IGF-1 (контроль) или без сыворотки, но содержащей IGF-1 в концентрации 20 нг/мл. На каждую линию клеток для эксперимента в присутствии IGF-1 и отсутствия (контроль) использовали не менее трех лунок. Эксперимент повторялся не менее трех раз. Далее, клетки инкубировали в течение 72 ч в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Через 72 ч в лунки 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид в объеме 25 мкл на 2–3 ч (срок инкубации зависит от метаболической активности митохондрий используемых клеток). Исходная концентрация вещества 5 мг/мл. Удаляли среду и добавляли 60 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) на лунку. Для гомогенного распределения красителя качали на шейкере в течение 3 мин при 300 об/мин. Анализ проводили на цитофотометре «Унискан» (Фирма «Пикон», Россия) при фильтре 595 нм. Жизнеспособность клеток при действии IGF-1 оценивалась сопоставлением оптической плотности в экспериментальных лунках с оптической плотностью в контрольных лунках. На основании полученных при сканировании данных строились графики, с учетом отклонения от средних значений. Для исследования влияния IGF-1 на выживаемость клеток ММ ставили не менее трех независимых экспериментов.

#### Подсчет клеток

Мы исследовали влияние IGF-1 на выживаемость клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226, IM9 методом подсчета. В эксперименте указанные клетки были посажены в количестве  $1,5 \times 10^6$  клеток на чашку и культивировались в среде без сыворотки в течение 72 ч в присутствии и отсутствии IGF-1 в концентрации 20 нг/мл (также как и в случае использования МТТ-метода). Через 72 ч подсчитывали среднее количество клеток (из трех чашек на культуру) каждой культуры и сравнивали полученные результаты.

#### Исследования кривой выживаемости

Мы исследовали влияние фактора роста IGF-1 на кривую выживаемости культур клеток RPMI1640, RPMI8226, IM9. Клетки указанных культур были посажены в количестве  $7 \times 10^4$  клеток на лунку в 1 мл среды без сыворотки в присутствии и отсутствии IGF-1 в концентрации 20 нг/мл, и их количество подсчитывали через каждые 24 ч в течение 96 ч. Затем по полученным после подсчета средним (из 6 лунок на культуру) результатам строили кривые выживаемости.

#### Выделение РНК из клеток ММ и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Для исследования экспрессии генов к осадку клеток добавляли 1 мл тризола (Trizol, “Sigma”, США). Процедуру выделения РНК проводили согласно стандартному протоколу. Электрофорез выделенной РНК проводили в 1 %-ном агарозном геле при напряжении 100 В в течение 30–40 мин. Качество выделенной РНК оценивали по наличию полос рибосомальной РНК. Концентрацию РНК определяли по оптическому поглощению при  $\lambda$  260 нм.

Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуквантитативным методом ОТ-ПЦР. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) (фирма «Литех», Россия), 1 мкл 25мМ смеси dNTP («МБИ Fermentas», Литва), 2–4 ед. ингибитора РНКаз («МБИ Fermentas»), 100 ед. обратной транскриптазы М-MuLV («МБИ Fermentas»). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция – 42 °С, 50 мин; денатурация – 94 °С, 5 сек. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую: 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 1 мкл 25мМ смеси dNTP («МБИ Fermentas»); 2,5 мкл 10-кратного буфера с  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  («МБИ Fermentas»), 25 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 1 ед. Таq-ДНК полимеразы;  $\text{H}_2\text{O}$  до конечного объема 25 мкл; минерального масла – 30 мкл. Нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров приведены в табл. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» по следующей схеме: денатурация – 94 °С, 10 сек; аннилинг –  $T_m$ , 10 сек; синтез – 72 °С, 20 сек значения температуры  $T_m$  и количество циклов ПЦР для каждого из генов приведены в таблице. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию *GAPDH*. Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2 %-ном агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК, гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры «Samsung CCTV LENZ».

#### Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prizm 5, 2008 год. Достоверность различий определялась с использованием непараметрического статистического критерия t-test, различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

#### Результаты

##### Исследование экспрессии мРНК генов системы IGF/инсулин (IGF-1A, IGF-1B, IGF-2, IGF-1R, IR-A, IR-B) в трех линиях клеток ММ человека

IGF-1 и его рецептор IGF-1R принадлежат системе IGF/инсулин, которая также включает: инсулин, инсулиноподобный фактор роста IGF-2, шесть типов IGF-связывающих и регулирующих белков (IGFBP) и их протеаз, а также различные изоформы и комбинации их общих рецепторов: IGF-1R, IR-A, IR-B (А и В изоформы рецептора инсулина), IGF-1R/IR-A, IGF-1R/IR-B (гибридные рецепторы). Активация перечисленных рецепторов опосредует сигналы, играющие различные роли в физиологии клетки, такие как: развитие, рост, дифференцировка, регуляция метаболизма, подвижность, опухолеродность чувствительность к апоптозу, ангиогенез, экспрессия молекул адгезии [2]. IGF-1 может связываться и активировать рецептор IR-A [18; 24], а также гибридный рецептор IGF-1R/IR-A [13; 14]. Со всеми указанными рецепторами: IR-A, IR-B и IGF-1R также может связывается IGF-2 [9; 37], который является высоко гомологичным IGF-1 [38]. В литературе описаны две изофор-

мы мРНК *IGF-1* (*IGF-1A* и *IGF-1B*), которые образуются в результате альтернативного сплайсинга, при этом обе они сохраняют нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерный пептид IGF-1, а С-концевые нуклеотидные последовательности этих двух изоформ кодируют два различных пептида, EA и EB. Функциональные значения изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* до конца неизвестны и в настоящее время исследуются.

Установлено, что про-IGF-1A пептид выделяется из клетки в межклеточное пространство, а про-IGF-1B пептид является активной внутриклеточной изоформой и обнаруживается в ядре клетки и, по-видимому, имеет регуляторную функцию [35]. Предполагается, что количественное соотношение этих изоформ может являться одним из факторов, определяющих дальнейшую судьбу клетки, т.е. в случае преобладания одной изоформы клетка будет пролиферировать, а другой – дифференцироваться [6].

В первой части исследования мы охарактеризовали экспрессию мРНК генов системы IGF/инсулин: *IGF-1A*, *IGF-1B*, *IGF-2*, *IGF-1R*, *IR-A*, *IR-B* – в трех линиях культур клеток ММ человека, RPM11640, RPM18226, IM-9 (рис. 1).

Экспрессия двух изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* выявлялась во всех трех линиях клеток ММ. Причем, в линиях клеток RPM18226 и IM9 экспрессия мРНК этих изоформ была примерно одинаковой и выраженной, а в линии клеток RPM11640 – очень слабой (рис. 1).

На сегодня в литературе нет работ, посвященных исследованию двух изоформ мРНК IGF-1 в миеломных клетках. Недавно в аспиратах костного мозга, полученных от больных ММ, нами была исследована экспрессия изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B*.

Экспрессии изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B* были выявлены у 63 % больных ММ. При сравнении случаев, когда обе эти изоформы присутствовали или отсутствовали в одних и тех же образцах, оказалось, что у 80 % больных изоформы мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B*, как правило, коэкспрессируются [3]. Таким образом, коэкспрессия *in vivo* и *in vitro* двух изоформ мРНК *IGF-1* является характерной особенностью миеломных клеток.

Экспрессия мРНК гена *IGF-2* была выраженной только в линии клеток RPM18226, а в двух других линиях клеток – RPM11640 и IM9 – ее экспрессия была чрезвычайно слабой, практически на уровне чувствительности, используемом для определения количества мРНК методом ОТ-ПЦР. Экспрессия мРНК *IGF-1R* была выраженной во всех трех линиях клеток ММ.

Уровень экспрессии мРНК *IR-A* был высоким в линиях клеток RPM11640 и RPM18226, а в линии клеток IM9 – слабым. мРНК *IR-B* не выявлялась ни в одной из трех линий клеток ММ. Таким образом, во всех трех линиях клеток ММ была выявлена экспрессия мРНК только А-изоформы рецептора инсулина (IR-A), тогда как В-изоформа (IR-B) не экспрессировалась. Полученные нами данные по экспрессии мРНК *IR-A* и *IR-B in vitro* в клетках ММ полностью совпадают с нашими данными полученными ранее, в которых мы показали, что в образцах от больных ММ, преимущественно экспрессируется мРНК *IR-A* [28].

Таким образом, наши исследования показали, что в трех линиях клеток ММ экспрессия мРНК генов, принадлежащих системе IGF/инсулин, отличается.



Таблица

Нуклеотидные последовательности специфичных праймеров к генам, размер продукта, температура отжига праймеров и количество циклов, используемых в ПЦР

| Ген    | Название праймера | Нуклеотидная последовательность      | Размер продукта, пары оснований | Темп-ра отжига праймера |
|--------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| IRA    | IRA-F             | 5'-AACCAGAGTGAGTATGAGGAT-3'          | 600 п.о.                        | 60°C                    |
|        | IRA-R             | 5'-CCGTTCCAGAGCGAAGTGCTT-3'          |                                 |                         |
| IRB    | IRB-F             | 5'-AACCAGAGTGAGTATGAGGAT-3'          | 636 п.о.                        | 60°C                    |
|        | IRB-R             | 5'-CCGTTCCAGAGCGAAGTGCTT-3'          |                                 |                         |
| IGF-1A | IGF-1A-F          | 5'-GGACCGGAGACGCTCTGCGG-3'           | 284 п.о.                        | 60°C                    |
|        | IGF-1A-R          | 5'-TCTACTTTCGTTCTTCAAAAT -3'         |                                 |                         |
| IGF-1B | IGF-1B-F          | 5'-GGACCGGAGACGCTCTGCGG-3'           | 431 п.о.                        | 60°C                    |
|        | IGF-1B-R          | 5'-TTTGCCTCTGCATTCAAGCAT-3'          |                                 |                         |
| IGF-1R | IGF-1R-F          | 5'-ATTGAGGAGGTCACAGAGAAC-3'          | 755 п.о.                        | 67°C                    |
|        | IGF-1R-R          | 5'-TTCATATCCTGTTTGGCCTG-3'           |                                 |                         |
| IGF-2  | IGF-2-F           | 5'-AGTCGATGCTGGTCTTCTCA-3'           | 486 п.о.                        | 60°C                    |
|        | IGF-2-R           | 5'-GTGGGCGGGTCTTGGGTGGGTAG-3'        |                                 |                         |
| Bcl-2  | Bcl-2-F           | 5'-CGACTTCGCCGAGATGTCAGCCAG-3'       | 389 п.о.                        | 61°C                    |
|        | Bcl-2-R           | 5'-ACTTGTGGCCAGATAGGCACCCAG-3'       |                                 |                         |
| Mcl-1  | Mcl-1-R           | 5'-CACGAGACGGCCTTCCAAGGCATGCT-3'     | 497 п.о.                        | 60°C                    |
|        | Mcl-1-F           | 5'-CTAGGTTGCTAGGGTGCAACTCTAGGA-3'    |                                 |                         |
| Bcl-xL | Bcl-xL-F          | 5'-TTGGACAATGGACTGGTTGA-3'           | 371 п.о.                        | 54°C                    |
|        | Bcl-xL-R          | 5'-TGGGATGTCAGGTCACATGAA-3'          |                                 |                         |
| HIAP-1 | HIAP-1-F          | 5'-GCCTGATGCTGGATAACTGG-3'           | 349 п.о.                        | 60°C                    |
|        | HIAP-1-R          | 5'-GGCGACAGAAAAGTCAATGG-3'           |                                 |                         |
| HIAP-2 | HIAP-2-F          | 5'-GCCTGATGCTGGATAACTGG-3'           | 361 п.о.                        | 60°C                    |
|        | HIAP-2-R          | 5'-GCTCTTGCCAATTCTGATGG-3'           |                                 |                         |
| NAIP   | NAIP-F            | 5'-TTATACCAGCGCCAGTTTCC-3'           | 299 п.о.                        | 60°C                    |
|        | NAIP-R            | 5'-GGTGGAACTAAGGGGAGG-3'             |                                 |                         |
| Surv   | Surv-F            | 5'-CTTGAAAGTGGCACCAGAGG-3'           | 290 п.о.                        | 60°C                    |
|        | Surv-R            | 5'-TGCAGCTCAGATTCAACAGG-3'           |                                 |                         |
| Livin  | Livin-F           | 5'-CTGGTCAGAGCCAGTGTTC-3'            | 311 п.о.                        | 60°C                    |
|        | Livin-R           | 5'-TCATAGAAGGAGGCCAGACG-3'           |                                 |                         |
| CycB1  | CycB1-F           | 5'-TTGGGGACATTGGTAACAAGTC-3'         | 204 п.о.                        | 64°C                    |
|        | CycB1-R           | 5'-ATAGGCTCAGGCCGAAAGTTTTT-3'        |                                 |                         |
| CycD1  | CycD1-F           | 5'-GCTGGAGCCCGTGAAAAGA-3'            | 228 п.о.                        | 63°C                    |
|        | CycD1-R           | 5'-CTCCGCCTCTGGCAATTTG-3'            |                                 |                         |
| GAPDH  | GAPDH-F           | 5'-CCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTT-3' | 513 п.о.                        | 60°C                    |
|        | GAPDH-R           | 5'-GGCCATGAGGTCCACCACCTGTTGCTGTA-3'  |                                 |                         |

Учитывая присутствие или отсутствие коэкспрессии лигандов и их рецепторов, принадлежащих системе IGF/инсулин, можно полагать, что в линии клеток IM9 экспрессируются мРНК *IGF-1*, *IGF-1R*, *IRA*, и возможно, что активными являются сигнальные пути, активируемые тремя лиганд-рецепторными аутокринными взаимодействиями: IGF-1/IGF-1R, IGF-1/IGF-1R/IRA, IGF-1/IRA (рис. 1). В клетках RPMI1640 вследствие очень слабой экспрессии мРНК *IGF-1* и чрезвычайно низкой экспрессии мРНК *IGF-2* (рис. 1) не исключено, что слабо активируются все внутриклеточные сигнальные пути, активируемые при любой возможной комбинации аутокринного взаимодействия лигандов и рецепторов системы IGF/инсулин.

Линия клеток RPMI8226 отличается от двух других исследованных линий клеток RPMI1640 и IM9 по экспрессии мРНК генов системы IGF/инсулин. Эта линия характеризуется выраженной экспрессией, и мРНК *IGF-1*, и мРНК *IGF-2*, и всех их рецепторов, и поэтому в линии клеток RPMI8226, возможно, активны сигнальные пути, активируемые пятью лиганд-рецепторными аутокринными взаимодействиями: IGF-1/IGF-1R, IGF-1/IRA, IGF-1/IGF-1R/IRA, IGF-2/IGF-1R и IGF-2/IRA (рис. 1). В связи с этим не исключено, что воздействие IGF-1 на клетки RPMI8226 может по-другому повлиять на их выживаемость и пролиферацию, чем на выживаемость и пролиферацию клеток RPMI1640 и IM9.

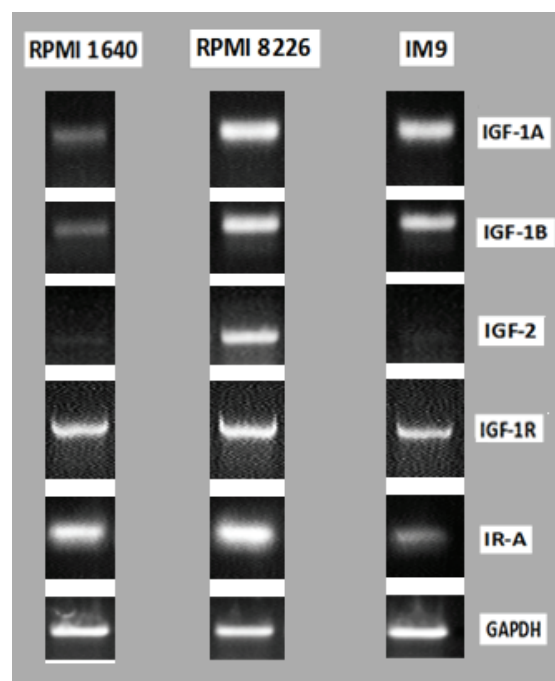
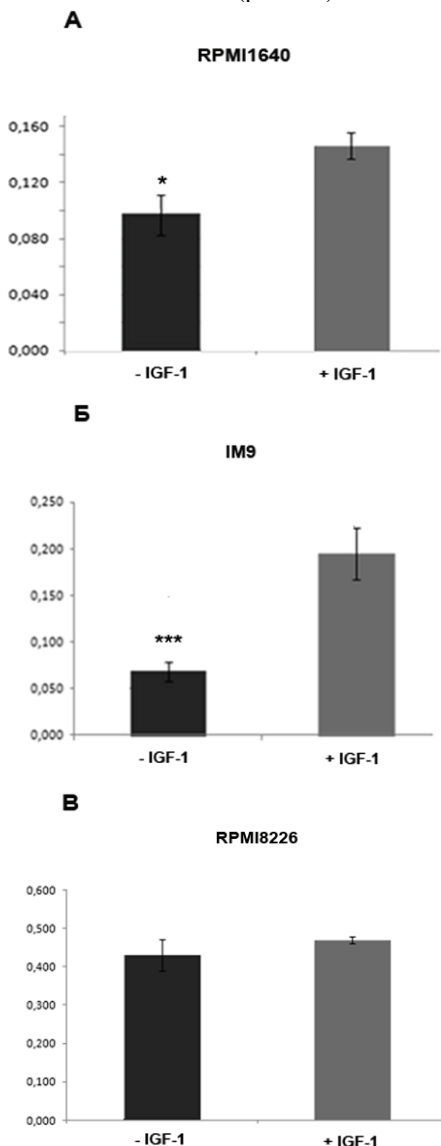


Рис. 1. Экспрессия мРНК генов системы IGF/инсулин в линиях клеток ММ человека (полуколичественный ОТ-ПЦР).

**Исследование влияния фактора роста IGF-1 на выживаемость клеток линий ММ человека методом МТТ**

Выживаемость клеток ММ человека исследовали методом МТТ (см. раздел Материалы и методы). Клетки культивировали в течение 72 ч в бессывороточной среде в присутствии и в отсутствие IGF-1 в концентрации 20 нг/мл. Последняя является физиологической, и в этом случае IGF-1 активирует только IGF-1R и не активирует IR-A. В таких условиях, с одной стороны исключены все факторы роста, присутствующие в сыворотке, которые могли бы кооперировать с IGF-1 и тем самым оказывать дополнительное влияние на выживаемость клеток ММ. С другой стороны, физиологические концентрации IGF-1 позволяют определять биологические эффекты, которые являлись бы следствием активации только IGF-1/IGF-1R-опосредуемой сигнальной трансдукции. В результате исследования мы выявили, что IGF-1 повышал выживаемость клеток RPMI1640 ( $p < 0,05$ ; рис. 2А) и IM9 ( $p < 0,0001$ ; рис. 2Б), и не влиял на выживаемость клеток RPMI8226 (рис. 2В).



**Рис. 2.** Выживаемость клеток RPMI1640, IM9 и RPMI8226 в среде без ТЭС в присутствии и отсутствии IGF-1 (МТТ-тест):

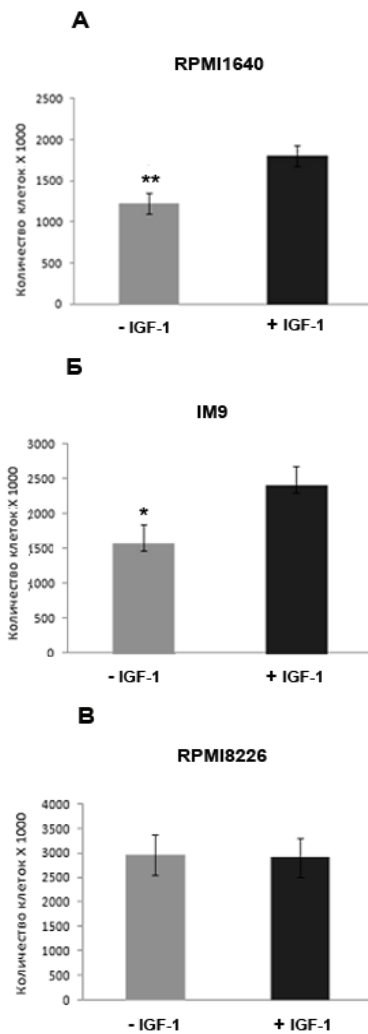
\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  – достоверность различия.

Несмотря на то, что иммунофенотип (экспрессия маркеров дифференцировки) клеток RPMI1640 ( $CD^{138+}$ ,  $CD^{38+}$ ,  $CD^{45-}$ ,  $CD^{56\pm}$ ,  $CD^{19-}$ ) и клеток RPMI8226 ( $CD^{138+}$ ,  $CD^{38+}$ ,  $CD^{45-}$ ,  $CD^{56\pm}$ ,  $CD^{19-}$ ) является одинаковым, и эти клетки морфологически выглядят очень похожими, оказалось, что они по-разному отвечают на воздействие IGF-1 (рис. 2А–В). Возможно, что одним из решающих факторов такого различия в выживаемости исследуемых линий клеток ММ является различие в экспрессии генов системы IGF/инсулин. Линия клеток RPMI8226 отличается от двух других исследованных линий клеток RPMI1640 и IM9 по экспрессии мРНК генов системы IGF/инсулин. В клетках RPMI8226 наблюдается выраженная экспрессия IGF-1 и IGF-2 и всех их рецепторов, что, возможно, позволяет аутокринным образом регулировать выживание и пролиферацию этих клеток в условиях культивирования без сыворотки. Внесение экзогенного IGF-1 существенно не изменяет существующую аутокринную лиганд-рецепторную регуляцию. Данная гипотеза в будущем будет проверяться в экспериментах в присутствии специфических ингибиторов IGF-1R и IRA.

**Исследование выживаемости клеток линий ММ человека методом подсчета**

В эксперименте клетки RPMI1640, RPMI8226, IM-9 сажали в количестве  $1,5 \times 10^6$  на чашку и культивировали в среде без сыворотки в течение 72 ч в присутствии/отсутствии IGF-1 в концентрации 20 нг/мл (также как и в случае использования МТТ метода). Через 72 ч подсчитывали среднее количество клеток (из трех чашек на культуру) каждой культуры и сравнили полученные результаты (рис. 3А–В).

Было установлено, что в присутствии IGF-1 через 72 ч количество клеток RPMI1640 и IM9 выросло (рис. 3А, Б). И наоборот, в среде без IGF-1 клетки RPMI1640 не только не росли, но их количество уменьшилось (рис. 3А), а количество клеток IM9, без сыворотки не увеличилось (рис. 3Б). Таким образом, данные, полученные в результате подсчета клеток ММ в присутствии и отсутствии IGF-1, как и в случае исследования выживаемости клеток ММ методом МТТ, показали, что экзогенный IGF-1 является фактором, регулирующим выживаемость клеток RPMI1640 и IM9, а также является фактором, регулирующим пролиферацию клеток ММ. Вместе с тем, экзогенный IGF-1 не влияет на выживаемость и пролиферацию клеток RPMI8226. Количество клеток RPMI8226 независимо от присутствия или отсутствия в среде IGF-1 за 72 часа выросло вдвое (рис. 3В). В клетках RPMI8226 наблюдается выраженная экспрессия IGF-1 и IGF-2 и всех их рецепторов, что, возможно, позволяет аутокринно регулировать выживание и пролиферацию этих клеток в условиях культивирования без сыворотки, и добавление экзогенного IGF-1 решительно не влияет на выживаемость и рост клеток RPMI8226. Данную гипотезу мы планируем проверить в экспериментах, в которых будем использовать ингибиторы и siRNA IGF-1R и IR с тем, чтобы разомкнуть цепи сигнальной трансдукции, идущие от этих рецепторов и понять, действительно ли в среде без сыворотки экспрессия лигандов IGF-1 и IGF-2, и их рецепторов IGF-1R и IR достаточна для поддержания аутокринной регуляции пролиферации и выживаемости клеток RPMI8226. Полученные данные полностью подтвердили данные результаты метода МТТ, а именно то, что IGF-1 усиливает выживаемость клеток RPMI1640 и IM9, и не влияет на выживаемость клеток RPMI8226 (рис. 3А–В).



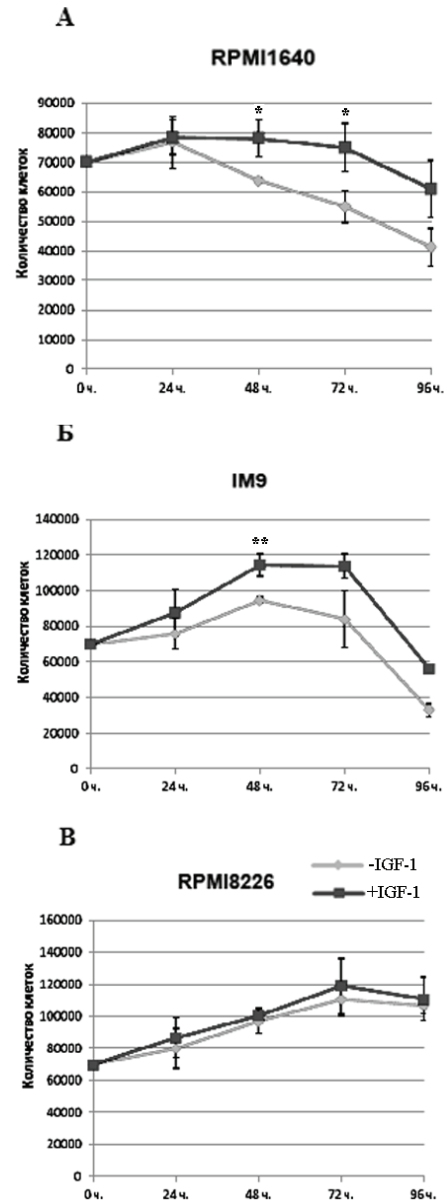
**Рис. 3.** Выживаемость клеток RPMI1640, IM9 и RPMI8226 в среде без ТЭС в присутствии и отсутствии IGF-1 (подсчет клеток): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  – достоверность различия.

#### Исследование влияния фактора роста IGF-1 на кривую выживаемости клеток линий ММ человека

В следующей части работы мы исследовали влияние фактора роста IGF-1 на кривую выживаемости культур клеток RPMI1640, RPMI8226 и IM-9 (рис. 4А–В).

Клетки указанных культур были посажены в количестве  $7 \times 10^4$  клеток на лунку в 1мл среды без сыворотки в присутствии и отсутствии IGF-1, и их количество подсчитывали через каждые 24 ч в течение 96 ч, по полученным после подсчета средним результатам строили кривые выживаемости (рис. 4А–В). Количество клеток RPMI1640 в присутствии IGF-1 через 72 ч незначительно выросло и достигло  $7,5 \times 10^4$  клеток на лунку (рис. 4А).

Напротив, при отсутствии IGF-1 количество клеток RPMI1640 начало уменьшаться уже через 24 ч, а через 72 ч их количество уменьшилось примерно до  $5,5 \times 10^4$  клеток в лунке. Вместе с тем, и в присутствии и в отсутствие IGF-1 через 96 ч количество клеток RPMI1640 уменьшилось и достигло в случае присутствия IGF-1 до  $6 \times 10^4$  клеток в лунке, а в случае отсутствия – до  $4 \times 10^4$  клеток в лунке.



**Рис. 4.** Кривая выживаемости клеток RPMI1640, IM9 и RPMI8226 в среде без ТЭС в присутствии и отсутствии IGF-1 (подсчет клеток): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  – достоверность различия.

Количество клеток IM9 в присутствии IGF-1 в течение 72 ч увеличилось примерно до  $11 \times 10^4$  клеток в лунке, а в отсутствие IGF-1 увеличилось до  $8 \times 10^4$  клеток в лунке (рис. 4Б). Через 96 ч количество клеток IM9 и в присутствии и в отсутствие IGF-1 уменьшилось и достигло в случае присутствия IGF-1  $6 \times 10^4$  клеток в лунке, а в случае отсутствия –  $3,5 \times 10^4$  клеток в лунке.

Клетки RPMI8226 продолжали расти и в присутствии и в отсутствие IGF-1, и через 72 ч их количество достигло в случае присутствия IGF-1  $12 \times 10^4$  клеток в лунке, а в случае отсутствия –  $11 \times 10^4$  клеток в лунке (рис. 4В). Вместе с тем через 96 ч количество клеток RPMI8226 и в присутствии, и в отсутствие IGF-1 незначительно уменьшилось (рис. 4В).

Таким образом, среди исследованных линий клеток ММ чувствительными к IGF-1 оказались клетки RPMI1640 и IM9, которые в присутствии IGF-1 начиная с 24 ч насчитывали большее количе-

ство клеток, чем в случае, когда IGF-1 отсутствовал (рис. 4А, Б). Очевидно, что в этих двух линиях клеток IGF-1 является фактором, поддерживающим выживаемость, а для клеток линии IM-9 IGF-1 оказывает пролиферативный эффект. Напротив, клетки RPMI8226 оказались практически нечувствительными к IGF-1, хотя присутствует очень незначительный пролиферативный эффект через 72 ч, однако его величина является чрезвычайно маленькой (рис. 4В).

Таким образом, очевидно, что данные, полученные методом МТТ, подсчета клеток и исследования кривых выживаемости клеток линий MM человека RPMI1640, RPMI8226, IM9, взаимно дополняемы и показывают, что IGF-1 является фактором выживаемости и фактором роста для клеток RPMI1640 и IM9, и не влияет на выживаемость и рост клеток RPMI8226. Мы объясняем это тем фактом, что в клетках RPMI8226 наблюдается выраженная экспрессия и IGF-1, и IGF-2, и всех их рецепторов, что, возможно, позволяет аутокринно регулировать выживание и пролиферацию этих клеток в условиях культивирования без сыворотки, и добавление экзогенного IGF-1 не влияет на выживаемость и рост этих клеток.

В литературе имеются работы, в которых исследовалась роль IGF-1 в выживаемости миеломных клеток. В 2009 г Sprynski и др. исследовали влияние различных факторов роста на выживаемость 9 линий миеломных клеток (XG-N) в среде без сыворотки. Среди этих 9 линий сначала были отобраны те, которые могли расти 4 дня в среде без сыворотки. Таковыми оказались 3 линии клеток: XG-5, XG-7 и XG-20. Ингибирование киназной активности IGF-1R в этих линиях приводило к резкому уменьшению их выживаемости [30]. В этой работе также было показано, что экзогенный IGF-1 является фактором, в разной степени, усиливающим пролиферацию большинства исследованных линий клеток [30]. Strömberg и др. показали, что ингибирование киназной активности IGF-1R в линии клеток RPMI8226 увеличило чувствительность этих клеток к доксорубину, мелфалану и дексаметазону [31]. Недавно в работе Tagoug I. и др. было исследовано совместное действие AS602868, ингибитора NF- $\kappa$ b сигнального пути, и моноклональных антител против IGF-1R в четырех линиях клеток MM человека: RPMI8226, LP1, MM.1S и U266. Исследования показали, что в двух из четырех линий клеток – RPMI8226 и LP1 комбинация указанного ингибитора и антител против IGF-1R усиливала апоптоз [32]. В другой работе было показано, что в мышинных клетках 5T33MM $\nu$  и в клетках MM человека Karpas707 и OPM-2, экзогенный IGF-1 негативно регулировал экспрессию проапоптотического гена *Bim*, и это коррелировало с усилением выживаемости этих клеток [7].

В отличие от перечисленных работ, мы не использовали ингибиторы киназной активности IGF-1R. Этот подход приемлем для исследования роли IGF-1 только в тех случаях, когда клетки MM могут расти некоторое время без сыворотки. Также мы не использовали, как авторы указанных выше статей, высокие (в пять раз превышающие нормы) концентрации экзогенного IGF-1. Концентрация IGF-1 в наших экспериментах соответствовала физиологической, т.е. той, в которой IGF-1 присутствует в сыворотке крови, и при которой этот фактор *in vivo* взаимодействует со своим рецептором.

Полученные нами результаты коррелируют с данными других авторов, и мы убедительно пока-

зали, что IGF-1 может являться фактором, усиливающим выживаемость клеток MM. Однако следует отметить, что не для всех клеток MM IGF-1 является фактором выживаемости. Как показали результаты наших экспериментов, IGF-1 является фактором выживаемости для миеломных клеток чувствительных к сыворотке (к ростовым факторам, присутствующим в сыворотке), как в случае с клетками RPMI1640, и не является фактором выживаемости для клеток менее чувствительных к сыворотке, как в случае с клетками RPMI8226. Также необходимо отметить, что влияние IGF-1 на выживаемость клеток MM не зависит от их дифференцировки. Например, в нашем случае и RPMI1640, и RPMI8226 экспрессируют на своей поверхности одинаковые маркеры дифференцировки, CD<sup>138+</sup>, CD<sup>38+</sup>, CD<sup>45-</sup>, CD<sup>56+</sup>, CD<sup>19-</sup> [16], однако по-разному отвечают на экзогенный IGF-1. Также следует подчеркнуть, что влияние IGF-1 на выживаемость клеток MM не зависит от экспрессии IGF-1R. Как показали наши эксперименты, все три линии исследуемых клеток MM экспрессировали IGF-1R, но их реакции на экзогенный IGF-1 отличались.

#### Исследование экспрессии мРНК генов *CycB1* и *CycD1* и мРНК генов, принадлежащих семействам *Bcl-2* и *IAP*

Мы исследовали экспрессию мРНК генов *CycB1* и *CycD1* в линиях клеток MM человека RPMI1640, RPMI8226 и IM-9 в среде без сыворотки, в присутствии и отсутствии IGF-1 (рис. 5). Известно, что эти гены экспрессируются при пролиферации клеток. Показано, что в клеточном цикле IGF-1/IGF-1R сигнальный путь индуцирует синтез *CycD1* и промотирует G<sub>1</sub>-S переход [25].

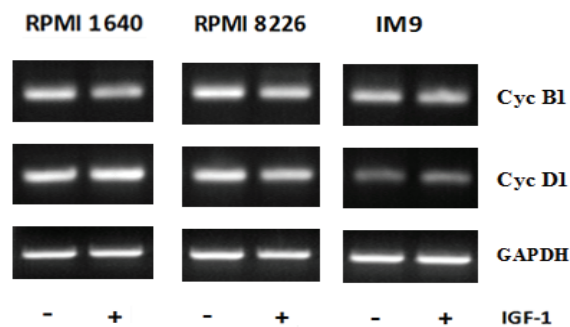


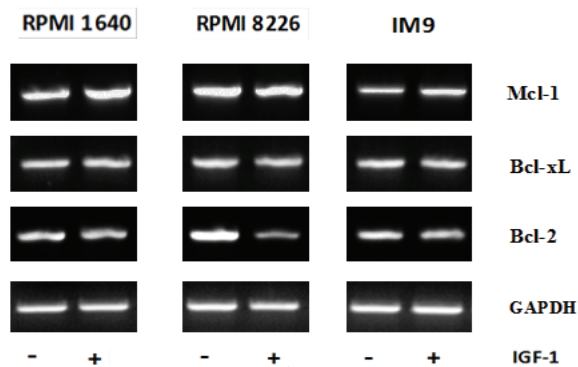
Рис. 5. Экспрессия мРНК генов *CycB1* и *CycD1* в линиях клеток MM человека в среде без ТЭС в присутствии и отсутствии IGF-1.

Этот сигнальный путь также может индуцировать экспрессию *CycA* и *CycB* и промотировать G<sub>2</sub>-M переход [25; 31]. Наши исследования показали, что экспрессия мРНК генов *CycB1* и *CycD1* во всех указанных линиях клеток является выраженной и не изменяется в присутствии IGF-1. Несмотря на то, что данные полученные методом МТТ-теста, подсчета клеток и исследования кривых выживаемости клеток MM человека, свидетельствуют в пользу того, что IGF-1 является фактором выживаемости и фактором роста для клеток RPMI1640 и IM-9, тем не менее, экспрессия мРНК генов *CycB1* и *CycD1* в указанных клетках в присутствии IGF-1 не изменяется. Мы не исследовали изменение экспрессии мРНК этих генов через 24 ч и 48 ч. Возможно, что именно в эти промежутки времени их экспрессия могла увеличиться, а через 72 ч, когда рост клеток останавливается, и количество клеток

начинает убывать, мы не обнаруживаем увеличения их экспрессии. Также не исключено, что в клетках RPMI1640I, RPMI8226, IM9 IGF-1 все же участвует в регуляции экспрессии генов *CycB1* и *CycD1* на уровне экспрессии их белков, и работу в этом направлении мы в будущем планируем выполнить. В литературе имеются несколько работ, в которых исследовалась экспрессия гена *CycD1* у больных ММ. Показано что гиперэкспрессия гена *CycD1* в клетках ММ коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания [5; 8; 13].

Известно, что во многих типах злокачественных клеток нарушен механизм, регулирующий запрограммированную клеточную гибель – апоптоз. Опухолевые клетки менее чувствительные к индукции апоптоза при лечении получают преимущество в борьбе за выживание, по сравнению с окружающими их нормальными клетками. На сегодня известны различные гены, участвующие в регуляции апоптоза. К ним относятся гены семейства *Bcl-2* и гены семейства ингибиторов апоптоза *IAP*.

Мы исследовали роль IGF-1 в регуляции экспрессии мРНК генов, принадлежащих семейству *Bcl-2*: *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl-1* в линиях клеток ММ человека RPMI1640, RPMI8226 и IM9 (рис. 6). Экспрессия мРНК исследуемых генов выявляется во всех трех линиях клеток ММ как в присутствии, так и в отсутствие экзогенного IGF-1 (рис. 6). В линии клеток RPMI1640 добавление экзогенного IGF-1 не влияет на изменение экспрессии мРНК генов *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl-1*. В линии клеток RPMI8226 экзогенный IGF-1 сильно подавляет экспрессию мРНК *Bcl-2* и не влияет на изменение экспрессии мРНК генов *Bcl-xL* и *Mcl-1*. В линии клеток IM9 IGF-1 увеличивает экспрессию мРНК гена *Mcl-1* и не влияет на экспрессию мРНК генов *Bcl-2*, *Bcl-xL*.

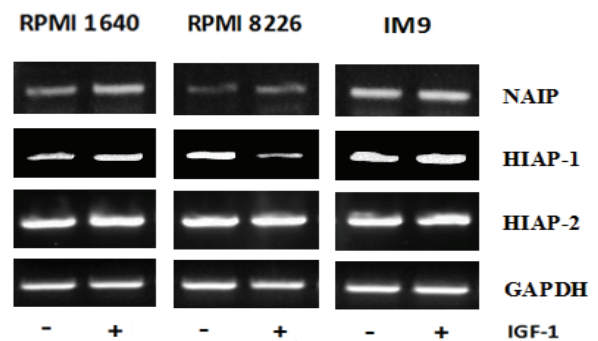


**Рис. 6.** Экспрессия мРНК генов семейства *Bcl-2*: *Mcl-1*, *Bcl-xL*, *Bcl-2* в линиях клеток ММ человека в среде без ТЭС, в присутствии и отсутствии IGF-1.

В литературе имеются работы, посвященные исследованию экспрессии мРНК генов, принадлежащих семейству *Bcl-2*: *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl-1* при множественной миеломе. В ходе исследований было показано, что уровень экспрессии *Bcl-2* при ММ достаточно высокий, но, в тоже время, вариабильный [22; 33]. Высокий уровень экспрессии *Mcl-1*, как было показано, ассоциируется с малигнизированным фенотипом клеток ММ [29]. Повышенная экспрессия *Bcl-2* и *Bcl-xL* ассоциируется с лекарственной устойчивостью к доксорубину, дексаметазону и этопозиду [10; 33; 34]. Защитный эффект экзогенного IGF-1 против дексаметазон-индуцированного апоптоза не коррелировал с изменением экспрессии *Bcl-2* и *Bcl-xL* [15; 36]. Тем не менее, совместное добавление дексаметазона

и *αIR3*, антитела, блокирующего активацию IGF-1R, приводило к уменьшению уровня экспрессии *Bcl-xL* в линиях леток ММ [21]. В другой работе было показано, что IGF-1-опосредуемое выживание клеток ММ коррелировало с повышением уровня экспрессии *Bcl-xL* на уровне транскрипции [26]. Таким образом, литературные данные являются противоречивыми, вместе с тем очевидно, что гены семейства *Bcl-2* участвуют в молекулярных механизмах злокачественной прогрессии ММ, что свидетельствует о необходимости продолжения изучения регуляции их экспрессии при ММ, в том числе и участия в этой регуляции факторов роста и их рецепторов, принадлежащих системе IGF/инсулин. Мы впервые показали, что в линии клеток RPMI8226 экзогенный IGF-1 заметно подавляет экспрессию мРНК *Bcl-2* и не влияет на изменение экспрессии мРНК генов *Bcl-xL* и *Mcl-1*. В линии клеток IM9 экзогенный IGF-1 увеличивает экспрессию мРНК гена *Mcl-1* и не влияет на экспрессию мРНК генов *Bcl-2*, *Bcl-xL*.

На следующем этапе мы исследовали IGF-1-зависимую экспрессию мРНК генов, принадлежащих к семейству ингибиторов апоптоза *IAP*: *HIAP-1*, *HIAP-2*, *NAIP*, *Livin* – в линиях клеток ММ человека RPMI1640, RPMI8226, IM9, (рис. 7). Экспрессия мРНК *HIAP-1*, *HIAP-2*, *NAIP* выявляется во всех трех линиях клеток ММ как в присутствии, так и в отсутствие IGF-1, а экспрессия мРНК *Livin* обнаруживается ни в одной из исследуемых линий (рис. 7). В клетках RPMI1640 и IM9 добавление экзогенного IGF-1 не влияет на изменение экспрессии мРНК генов *HIAP-1*, *HIAP-2*, *NAIP*.



**Рис. 7.** Экспрессия мРНК генов семейства ингибиторов апоптоза *IAP*: *HIAP-1*, *HIAP-2*, *NAIP* в линиях клеток ММ человека в среде без ТЭС, в присутствии и отсутствие IGF-1.

В линии клеток RPMI8226 экзогенный IGF-1 сильно подавляет экспрессию мРНК *HIAP-1* и не влияет на изменение экспрессии мРНК генов *HIAP-2* и *NAIP*. Также мы исследовали IGF-1-зависимую экспрессию мРНК генов *Survivin* и *XIAP*. Предварительные результаты показали, что экспрессия этих генов не зависит от присутствия IGF-1, однако, полученные данные не приведены в этой статье, поскольку они требуют подтверждения.

Изучение роли генов, принадлежащих к семейству ингибиторов апоптоза *IAP*, в злокачественной прогрессии опухолей человека является на сегодня актуальной. Работ, посвященных их роли при ММ, не так много. Что касается регуляции их экспрессии, показано, что в клетках ММ IGF-1 повышает экспрессию *HIAP-2* и *XIAP* [20]. Другой член семейства *IAP* *survivin*, как было показано, экспрессируется во многих трансформированных линиях клеток и в злокачественных опухолях [17].

В некоторых линиях клеток ММ IGF-1 усиливал экспрессию *survivin* [20]. Также было показано, что экспрессия рекомбинантного *survivin* в пре-В линии клеток увеличивала выживаемость этих клеток в среде без сыворотки [4]. Имеются и другие работы, посвященные роли генов, принадлежащих к семейству ингибиторов апоптоза IAP в злокачественной прогрессии опухолей человека. Вместе с тем в этих работах недостаточно уделено внимания роли IGF-1/IGF-1R опосредованной регуляции экспрессии генов, принадлежащих к семейству ингибиторов апоптоза IAP. Мы впервые установили, что в исследованных нами клетках ММ экспрессия мРНК гена *HIAP-1*, является IGF-1/IGF-1R зависимой, в то время как экспрессия мРНК генов *HIAP-2*, *NAIP* не зависит от активации IGF-1/IGF-1R сигнального пути.

В результате исследований мы установили, что в линиях клеток множественной миеломы человека RPM11640, RPM18226, IM-9 экспрессия мРНК генов *Bcl-2*, *Mcl-1*, *HIAP-1* является IGF-1/IGF-1R зависимой, в то время как экспрессия мРНК генов *Bcl-xL*, *HIAP-2*, *NAIP*, *CycB1*, *CycD1* не зависит от активации IGF-1/IGF-1R сигнального пути.

Таким образом, наши исследования показали, что линия клеток RPM18226 отличается от двух других исследованных линий клеток, RPM11640 и IM9, по экспрессии мРНК генов системы IGF/инсулин. Эта линия характеризуется выраженной экспрессией мРНК *IGF-1* и мРНК *IGF-2*, и всех их рецепторов, и поэтому в этой линии возможно большее количество различных комбинации лиганд-рецепторных аутокринных взаимодействий, что может усилить выживание и пролиферацию этих клеток в условиях культивирования без сыворотки. Предположение будет проверено в будущих экспериментах, в которых мы будем исследовать каждое возможное лиганд-рецепторное взаимодействие методом исключения. В этих целях мы будем использовать новый специфический ингибитор тирозинкиназной активности IGF-1R picropodophyllin (PPP) и интерферирующие РНК (siRNA) к рецепторам IGF-1R, IR-A, IR-B. Это позволит нам дать ответ на вопрос, какие именно комбинации лиганд-рецепторного взаимодействия системы IGF/инсулин и индуцируемые ими внутриклеточные сигнальные пути вовлечены в выживаемость и пролиферацию исследуемых клеток ММ.

### Заключение

Одним из злокачественных свойств клеток ММ является их способность мигрировать и локализоваться в костном мозге. В микроокружении костного мозга миеломные клетки взаимодействуют

с клетками стромы (фибробластами) и активируют в них транскрипцию и секрецию цитокинов и факторов роста, которые впоследствии паракринным образом воздействуют на миеломные клетки. В тоже время сами клетки ММ при взаимодействии с элементами костномозгового окружения (фибробластами, белками внеклеточного матрикса) экспрессируют цитокины и факторы роста, которые могут воздействовать аутокринно. Паракринное и аутокринное действие цитокинов и факторов роста на клетки ММ могут придать им более агрессивные свойства – усилить пролиферацию, выживаемость, индуцировать формирование опухолевого клона, активировать механизмы возникновения лекарственной устойчивости и активировать разрушения кости. Поэтому исследование роли цитокинов и факторов роста в злокачественной прогрессии ММ является на сегодня актуальным.

Одним из факторов роста, присутствующим в большом количестве в микроокружении костного мозга, является IGF-1. Он продуцируется фибробластами и остеобластами и, как предполагается, воздействует на клетки ММ, и может усилить их выживаемость и пролиферацию.

В своей работе мы исследовали *in vitro* роль IGF-1 в злокачественной прогрессии ММ на моделях культур клеток ММ человека RPM11640, RPM18226 и IM9. Все исследуемые линии клеток экспрессировали мРНК *IGF-1* и мРНК его рецепторов *IGF-1R* и *IR-A*. Данные, полученные методом МТТ-теста, подсчета клеток и исследования кривых выживаемости, показали, что IGF-1 является фактором, повышающим выживаемость и пролиферацию клеток ММ.

Известно, что выживаемость клеток ММ могут регулировать гены семейств *Bcl-2* и IAP. Предварительные исследования показали, что в регуляции экспрессии генов семейств *Bcl-2* и IAP может участвовать IGF-1/IGF-1R-опосредуемый сигнальный путь. Однако имеющиеся в литературе данные, являются противоречивыми.

Мы исследовали роль экзогенного IGF-1 в выживании трех линий клеток ММ человека: RPM11640, RPM18226 и IM9, а также исследовали роль IGF-1 в регуляции экспрессии мРНК генов, участвующих в апоптозе: *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl-1*, *HIAP-1*, *HIAP-2*, *survivin*, *NAIP*. В ходе исследований мы установили, что экспрессия мРНК генов *Bcl-2*, *Mcl-1*, *HIAP-1*, является IGF-1 зависимой, в то время как экспрессия мРНК генов *Bcl-xL*, *HIAP-2*, *NAIP*, *CycB1*, *CycD1* не зависит от IGF-1.

Таким образом, результаты наших исследований *in vitro* свидетельствуют в пользу того, что IGF-1 является фактором, усиливающим выживаемость клеток ММ.

### Литература

1. *Вотьякова О.М., Демина Е.А.* Множественная миелома. – Клиническая Онкогематология. Руководство для врачей под редакцией профессора Волковой М.А. (Издание второе, переработанное и дополненное). М.: «Медицина», 2007. – С. 847–73.
2. *Шушанов С.С.* Роль инсулиноподобного фактора роста 1 типа (IGF-1) и некоторых других членов системы IGF/инсулин в прогрессии множественной миеломы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 71–80.
3. *Шушанов С.С., Маркина Л.Г., Черных Ю.Б. и др.* Коэкспрессия мРНК генов систем IGF/инсулин и множественной лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой // Клиническая Онкогематология. – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 105–13.
4. *Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. et al.* A novel anti-apoptosis gene, *survivin*, expressed in cancer and lymphoma // *Nat Med.* – 1997. – 3. – P. 917–21.
5. *Athanasiou E., Kaloutsi V., Kotoula V. et al.* Cyclin D1 overexpression in multiple myeloma. A morphologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study of 71 paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2001. – 116. – P. 535–42.

6. Barton E.R. The ABCs of IGF-1 isoforms: impact of muscle hypertrophy and implications for repair. *Appl. Physiol // Nutr. Metab.* – 2006. – 31. – P. 791–7.
7. De Bruyne E., Bos T. J., Schuit F. et al. IGF-1 suppresses Bim expression in multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms // *Blood.* – 2010. – 115. – P. 2430–40.
8. Filipits M., Pohl G., Stranzl T. et al. Low p27 Kip1 expression is an independent adverse prognostic factor in patients with multiple myeloma // *Clin. Cancer. Res.* – 2003. – 9. – P. 820–6.
9. Frasca F., Pandini G., Scalia P. et al. Insulin receptor isoform A a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells // *Mol Cell Biol.* – 1999. – 19. – P. 3278–88.
10. Gazitt Y., Fey V., Thomas C. et al. Bcl-2 overexpression is associated with resistance to dexamethasone, but not melphalan, in multiple myeloma cells // *Int J Oncol.* – 1998. – 13. – P. 397–405.
11. Hernandez-Sanchez C., Werner H., Charles T. et al. Differential Regulation of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor Gene Expression by IGF-I and Basic Fibroblastic Growth Factor // *JBC.* – 1997. – 272(8). – P. 4663–70.
12. Hideshima T., Bergsagel P.L., Kuehl W.M. et al. Advances in Biology of Multiple Myeloma: Clinical Applications // *Blood.* – 2004. – 104. – P. 607–18.
13. Hoechtlen-Wollmar W., Menzel G., Bartl R. et al. Amplification of cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance // *Br. J Haematol.* – 2000. – 109. – P. 30–8.
14. Jaffe E.E., Harris N., Stein H. et al. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues – Lyon: IRC Press, 2001. – 351 p.
15. Jourdan M., De Vos J., Mechtli N. et al. Regulation of Bcl-2 - family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1 // *Cell Death Differ.* – 2000. – 7. – P. 1244–52.
16. Kalitin N., Kostjukova M., Kakpakova E. et al. Vascular endothelial growth factor 1 (VEGFR1) gene expression depends on immunophenotype of human multiple myeloma cells // *Eur J Cancer.* – 2011. – 47(1). – S644.
17. LaCasse E.S., Baird S., Korneluk R.G. et al. The inhibitors of apoptosis (IAP) and their emerging role in cancer // *Oncogene.* – 1998. – 17. – P. 3247–59.
18. Ludwig T., Eggenschwiller J., Fisher P. et al. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *igf2* and *igf-1r* null backgrounds // *Dev Biol.* – 1996. – 177. – P. 517–35.
19. Mitsiades C.S., Mitsiades N., Kung A.L. et al. The IGF/IGF-1R system is a major therapeutic target for multiple myeloma, other hematologic malignancies and solid tumors // *Blood.* – 2002. – P. 100–170a.
20. Mitsiades C.S., Mitsiades N., Poulaki V. et al. Activation of NF-kappa B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications // *Oncogene.* – 2002. – 21. – P. 5673–83.
21. Ogawa M., Nishiura T., Oritani K. et al. Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P. 4262–9.
22. Pettersson M., Jernberg-Wiklund H., Larsson L.-G. et al. Expression of the *bcl-2* Gene in Human Multiple Myeloma Cell Lines and Normal Plasma Cells // *Blood.* – 1992. – 179(2). – P. 495–502.
23. Raab M.S., Podar K., Breitkreutz I. et al. Multiple myeloma // *Lancet.* – 2009. – 374. – P. 324–39.
24. Sacco A., Morcavallo A., Pandini G. et al. Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A // *Endocrinology.* – 2009. – 150(8). – P. 3594–602.
25. Samani A.A., Yakar S., LeRoith D. et al. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights // *Endocrine Reviews.* – 2007. – 28. – P. 20–47.
26. Singleton J.R., Dixit V.M., Feldman E.L. et al. Type I insulin-like growth factor receptor activation regulates apoptotic proteins // *J Biol Chem.* – 1996. – 271. – P. 31791–4.
27. Slaaby R., Schaffer L., Laurrup-Larsen I. et al. Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant // *J Biol Chem.* – 2006. – 281. – P. 25869–74.
28. Soos M.A., Field C.E., Siddle K. et al. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity // *Biochem J.* – 1993. – 290. – P. 419–426.
29. Spets H., Stromberg T., Georgii-Hemming P. et al. Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin - 6 (IL-6) - induced growth and survival // *Eur. J. Haematol.* – 2002. – 69. – P. 76–89.
30. Sprynski A.C., Hose D., Caillot L. et al. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor // *Blood.* – 2009. – 113. – P. 4614–26.
31. Stromberg T., Ekman S., Girnita L. et al. IGF-1 receptor tyrosine kinase inhibition by the cyclolignan PPP induces G2/M-phase accumulation and apoptosis in multiple myeloma cells // *Blood.* – 2006. – 107. – P. 669–78.
32. Tagout I., Sauty De Chalon A., Dumontet C. Inhibition of IGF-1 Signalling Enhances the Apoptotic Effect of AS602868, an IKK2 Inhibitor, in Multiple Myeloma Cell Lines // *PLoS ONE.* – 2011. – 6(7): e22641. doi:10.1371/journal.pone.0022641
33. Tu Y., Xu F., Liu J. et al. Upregulated Expression of BCL-2 in Multiple Myeloma Cells Induced by Exposure to Doxorubicin, Etoposide, and Hydrogen Peroxide // *Blood.* – 1996. – 88(5). – P. 1805–12.
34. Tu Y., Renner S., Xu F. et al. BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance // *Cancer Res.* – 1998. – 58. – P. 256–62.
35. Weber J.D., Kuo M.L., Bothner B. et al. Cooperative signals governing ARF mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – 20. – P. 2517–28.
36. Xu F., Gardner A., Tu Y. et al. Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors // *Br. J. Haematol.* – 1997. – 97. – P. 429–40.
37. Yamaguchi Y., Flier J.S., Yokoto A. et al. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells // *Endocrinology.* – 1991. – 129. – P. 2058–66.
38. Yu H., Rohan T. Role of insulin-like growth factor family in cancer development and progression // *J Natl Cancer Inst.* – 2000. – 92. – P. 1472–89.

## СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ММ – множественная миелома

УДК 616.345-006.66:578.245.2:575.113

*Т.М. Соколова<sup>1,2</sup>, Е.Н. Кособокова<sup>3</sup>, А.Н. Шувалов<sup>1</sup>, И.М. Шаповал<sup>1</sup>, В.С. Косоруков<sup>3</sup>, Ф.И. Ершов<sup>1</sup>***АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА  
В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА HCT-116:  
РЕГУЛЯЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ИНТЕРФЕРОНАМИ-АЛЬФА-2  
ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ**<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва<sup>2</sup>ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» МЗ РФ, Москва<sup>3</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва**Контактная информация***Соколова Татьяна Михайловна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории энзимологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ и лаборатории интерфероногенеза НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ***адрес:** 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 16; тел. +7(499)516-5804**e-mail:** [tmsokolovavir@mail.ru](mailto:tmsokolovavir@mail.ru)

Статья поступила 02.04.2013, принята к печати 09.07.2013.

**Резюме**

Широкий спектр действия ИФН обеспечил их активное применение в качестве противовирусного и антибактериального средства. Однако использование этих цитокинов в онкологии ограничено определенными формами рака. Во многом это объясняется недостаточностью знаний о механизме действия разных типов ИФН в опухолевых клетках. Целью данной работы стало изучение активности генов системы ИФН в клетках аденокарциномы толстой кишки HCT-116 при помощи ОТ-ПЦР. Для сравнения использовали линию клеток фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-977. В ходе работы проанализировали целый спектр генов, охватывающих основные биологические активности ИФН (антивирусную, антипролиферативную и иммуномодулирующую). Сравнили 5 отечественных препаратов рекомбинантных ИФН- $\alpha$ -2b. Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки аденокарциномы толстого кишечника HCT-116 характеризуются отсутствием экспрессии ряда генов системы ИФН (ИФН- $\beta$ -1, ИФН- $\gamma$ , ИСГ-15) и сигнальных регуляторов апоптоза (Fas-рецептора и ИЛ6). В них снижены уровни активности генов семейства ИФН- $\alpha$ , но проявляется высокая конститутивная активность протоонкогена Bcl-2 и повышены уровни экспрессии генов ИФН- $\lambda$ -1 и ИФН-зависимых ферментов (ОАС1, дсПК и РНКазы), ИЛ4 и ИЛ17. Позитивным свойством исследованных препаратов ИФН- $\alpha$ -2b является подавление экспрессии протоонкогена Bcl-2 и активация транскрипции генов ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\lambda$  и ИФН-зависимых ферментов в опухолевых клетках HCT-116.

**Ключевые слова:** интерферон, опухолевые клетки, фибробласты, экспрессия генов, рекомбинантные белки.*T.M. Sokolova<sup>1,2</sup>, E.N. Kosobokova<sup>3</sup>, A.N. Shuvalov<sup>1</sup>, I.M. Shapoval<sup>1</sup>, V.S. Kosorukov<sup>3</sup>, F.I. Ershov<sup>1</sup>***INTERFERON SYSTEM GENE ACTIVITY  
IN COLON ADENOCARCINOMA CELLS HCT-116:  
REGULATION BY INTERFERON-ALPHA-2B  
FROM BACTERIA OR PLANTS**<sup>1</sup>FSBI «N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Moscow<sup>2</sup>FSBI «D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow<sup>3</sup>FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow**Abstract**

Broad activity spectrum of IFNs has assured its wide application as antiviral and antibacterial agent. However this cytokine is used for treatment of certain cancer types only. Mainly it is explained by lack of knowledge about IFN antitumor action mechanism. Hereafter we describe the study of IFN system gene activity in colon adenocarcinoma cells (HCT-116) using RT-PCR. Human lung embryo fibroblast (HLEF-977) was used for comparison. Multiple IFN system functional genes were analyzed. Five medicaments, produced in Russia, were compared with each other. Results show that the inherency of cancer HCT-116 cells is absence of expression of several apoptosis signal regulator and IFN system genes. The IFN-alpha family gene activity level is lower, but protooncogene Bcl-2 shows high activity and IFN- $\lambda$ -1, IFN-dependent enzymes, IL4 and IL17 gene expression levels are higher in these cells. Positive feature of analyzed medicaments is suppressed protooncogene Bcl-2 expression and activated IFN- $\alpha$ , IFN- $\lambda$ -1 and IFN-dependent enzymes gene transcription colon adenocarcinoma cells HCT-116.

**Key words:** interferon, cancer cell lines, fibroblasts, gene expression, recombinant proteins.**Введение**

Антивирусные, антипролиферативные и иммуномодулирующие активности ИФН являются основой их терапевтического применения [1; 15]. Человеческие ИФН классифицированы в 3 типа ( $\alpha/\beta$  –

I,  $\gamma$  – II и  $\lambda$  – III тип). ИФН действуют через специфические рецепторы на поверхности клеток и индуцируют сигнальные процессы, приводящие к активации многих ИФН-зависимых генов, в т.ч. и генов самих ИФН [22]. Наиболее изучены механизмы антивирусного и антипролиферативного действия



ИФН, связанные с участием генов, кодирующих ряд дсРНК-зависимых белков-ферментов (олигоаденилатсинтазы/РНКазы L и протеинкиназы) [24]. Особый интерес представляет регуляция ИСГ 15. Он кодирует убиквитиноподобный белок, способный взаимодействовать и модифицировать клеточные сигнальные факторы NFκB, IRF3 и др. [21]. Белок ИСГ15 секретируется клетками, проявляет цитокиновую активность и влияет на развитие опухолей. Иммуномодулирующие свойства ИФН обусловлены активирующим действием на иммунокомпетентные клетки (дендритные, макрофаги, Т- и В-лимфоциты). ИФН вызывает их пролиферацию, дифференцировку и продукцию ими цитокинов [17].

В 9-й хромосоме человека локализовано многочисленное семейство генов α-ИФН. Описано 13 экспрессируемых вариантов ИФН-α, их них α-2 и α-8 имеют наиболее высокую антивирусную активность [10]. Широкое применение в медицине получили препараты рекомбинантных ИФН-α-2b, которые являются универсальными средствами профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций [2].

Применение ИФН в онкологии пока ограничено определёнными формами рака [4]. Во многом это объясняется недостаточностью знаний о механизмах действия разных видов ИФН в опухолевых клетках. Известно, что в клетках разных видов опухолей человека происходят существенные нарушения в регуляции активности клеточных генов. В генах ключевых эффекторов системы ИФН и апоптоза обнаружены мутации, что приводит к снижению их функциональной активности [12].

Проведенный в опухолевых клетках анализ генной экспрессии преимущественно охватывает протоонкогены, факторы апоптоза, ангиогенеза и пролиферации, и мало затрагивает гены системы ИФН. Для изучения молекулярных механизмов действия известных и вновь созданных отечественных препаратов ИФН в настоящей работе применен количественный ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов.

Проведено сравнение конститутивной и ИФН-индуцированной экспрессии генов в 2 линиях клеток: НСТ-116 (аденокарцинома толстой кишки) и ФЛЭЧ-977 (фибробласты легкого эмбриона человека). Опухолевые клетки НСТ-116, в отличие от ФЛЭЧ, малочувствительны к ИФН [11].

Проанализирована экспрессия генов 4 видов ИФН (α, β-1, γ, λ-1), 3 генов ИФН-зависимых ферментов (ОАС1-олигоаденилатсинтазы, дсПК-дсРНК-зависимой протеинкиназы, РНКазы L), 2 генов регуляторов апоптоза (Fas-рецептора и протоонкогена Bcl-2) и 3 генов интерлейкинов, участвующих в иммунном ответе (ИЛ4, ИЛ6 и ИЛ17). Спектр выбранных генов во многом охватывает основные биологические активности присущие ИФН (антивирусную, антипролиферативную и иммунорегуляторную).

Перед нами стояли 2 задачи:

- 1) выяснить особенности реакции генов опухолевых клеток аденокарциномы толстой кишки НСТ-116 на ИФН-α-2;
- 2) сравнить действие 5 отечественных препаратов человеческих рекомбинантных ИФН-α-2b: 4 из них получены из бактериального продуцента (*Esch. coli*) и 1 – из растительного (*Nicotiana benthamiana*). В рамках данной работы нами впервые показана способность представленных рекомбинантных ИФН индуцировать транскрипцию клеточных генов.

## Материалы и методы

### Клетки

#### аденокарциномы толстой кишки НСТ-116 и фибробласты лёгкого эмбриона человека ФЛЭЧ-977

Линия клеток аденокарциномы толстой кишки НСТ-116 (*colon adenocarcinoma cells*, ATCC catalog No. CCL-247) получена из банка опухолевых клеток ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10 %-ной ТЭС и антибиотиками. Фибробласты лёгкого эмбриона человека (линия ФЛЭЧ-977) приобретены в Медико-генетическом центре РАМН (Москва). ФЛЭЧ выращивали в питательной среде DMEM с 10 %-ной ТЭС и антибиотиками.

### Препараты человеческих рекомбинантных ИФН-α

Изучено 5 препаратов:

- Реаферон – известный отечественный ИФН-α-2b (ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск), выпускаемый в ампулах с активностью 1 млн МЕ;
- три оригинальных препарата ИФН-α-2b, синтезированные в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН (два получены из бактериального продуцента *E.coli*, ИФН-α-2b-6His и ИФН-α-2b-12His [5], и один фитоИФН-α-2b-6His, получен из растительного продуцента *N. benthamiana* (неопубликованные данные);
- препарат ИФН-α-2a с активностью  $2 \times 10^8$  МЕ/мл приобретён в ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург).

### Противовирусная активность препаратов и реакция нейтрализации

Определяли на чувствительных к ИФН клетках ФЛЭЧ-977 микрометодом по подавлению ЦПД вируса ЭМК 100 доз ЦПД<sub>50</sub>. Клетки инкубировали с ИФН 24 ч при 37 °С, в 5 % CO<sub>2</sub>, затем ИФН удаляли, а клетки заражали вирусом. Результаты вирусного ЦПД учитывали в световом микроскопе. Ставили реакцию нейтрализации ИФН активности с моноклональными антителами (МКА РС/IF1 A001 и РС/IF3 A004) к рекомбинантному ИФН-α-2 (ООО «Протеиновый контур»). К высокоактивным препаратам ИФН-α-2 добавляли равный объём МКА, разведенных в 100 раз, и инкубировали смесь 1 ч при 37 °С. «Контроль 1» – те же препараты ИФН без добавления МКА (положительный) и «контроль 2» – МКА без добавления ИФН (отрицательный), инкубированные параллельно в тех же условиях.

### Анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Постановку опытов на обоих типах клеток осуществляли в 96-луночных планшетах. Эксперименты повторяли 2 раза. В лунки высевали клетки в концентрации 200–400 тыс./мл и через 48 ч, после образования клеточного монослоя, производили смену питательной среды на свежую. Затем вносили исследуемые препараты ИФН в дозе 500–10000 МЕ/мл на срок 24 ч при 37 °С. Контролем служили клетки необработанные ИФН. Клетки монослоя промывали 0,1 М фосфатным буфером pH 7, лизировали реагентом Trizol (Invitrogen) по инструкции и замораживали –20 °С. Объединяли образцы 6 аналогичных лунок. Суммарное количество клеток со-

ставляло примерно 0,5–1 млн. Выделенную смесь тризол+хлороформ суммарную РНК, осаждали изопропанолом и обрабатывали ДНКазой (набор «DNA-free» Ambion) по инструкции. Суммарную кДНК получали в реакции обратной транскрипции (ОТ) с праймерами олиго(dT)15 или random (случайные). Все использованные в реакции ОТ реактивы (фермент MMuLV, RNAsin, 4 вида dNTP) были производства фирмы «Promega», США. В количественной ОТ-ПЦР анализировали разведения кДНК 1/5 и 1/50 в зависимости от выявляемых конститутивных уровней транскрипции генов. Смешивали кДНК со специфическими парами праймеров и готовой 2-кратной смесью SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США). Структура праймеров на консервативные участки мРНК ИФН- $\alpha$  (подвиды 4; 7; 8 и 21), ферментов олигоденилатсинтетазы (ОАС1) и дсРНК-протеинкиназы (дсПК), Fas-рецептора и протоонкогена Bcl-2 опубликованы нами ранее [6; 7]. Дополнительно в программах «Primer Express» и «Primer 3 blast» были рассчитаны новые пары праймеров к мРНК ИФН- $\beta$ -1, ИФН- $\gamma$ , ИФН- $\lambda$ -1, ИФН-стимулируемого гена (ИСГ)15, РНКазы L и ИЛ6 (табл. 1). Праймеры к мРНК ИЛ4, ИЛ17 и рибосомальной 18S описаны в литературе [16; 23; 25].

ПЦР ставили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени. Протокол ПЦР: 96 °C 2 мин, далее 45 циклов 94 °C 10 сек, 50–54 °C 20 сек, 72 °C 30 сек. Пороговые циклы (Cq) логарифмической фазы синтеза регистрировали по нарастанию флюоресцентного сигнала интеркалирующего в ДНК красителя EvaGreen.

Анализ экспрессии генов выполняли с помощью программы «Gene Expression analysis CFX-96» двумя способами:

- 1)  $\delta$ Cq – относительно контроля принятого за 1 (оценка действия препаратов ИФН)
- 2) нормализуя уровни на референс 18S рибосомальную РНК (сравнение конститутивных уровней экспрессии в двух типах клеток) [20].

В конечной точке ПЦР по температурным пикам плавления устанавливали специфичность ДНК-продуктов и анализировали их электрофорезом в агарозном геле на соответствие расчётным размерам. Негативный контроль (без кДНК) не давал специфических амплификатов. Эффективность амплификации (E) оценивали в разведениях кДНК по калибровочной кривой (величина E составляла 90–100 %).

## Результаты и обсуждение

### **Противовирусная активность и антигенная специфичность препаратов ИФН- $\alpha$ -2 бактериального и растительного происхождения**

В табл. 2 приведены данные экспериментов по определению противовирусной активности исследованных рекомбинантных ИФН- $\alpha$ -2 в культуре фибробластов лёгкого эмбриона человека ФЛЭЧ-977. Использовали стандартный метод, основанный на эффекте подавления ЦПД вируса ЭМК в чувствительной к ИФН клеточной культуре. Все исследованные препараты рекомбинантных ИФН- $\alpha$ -2 в клетках ФЛЭЧ сохраняли достаточно высокую биологическую активность в процессе хранения при 10 °C (1 мес.) и способность взаимодействовать с МКА А001. Разновидности  $\alpha$ -2a и  $\alpha$ -2b ИФН не отличались по уровню нейтрализации МКА. Бактериальные ИФН- $\alpha$ -2b-6His и ИФН- $\alpha$ -2b-12His и растительный фитоИФН- $\alpha$ -2b-6His, имеющие конформа-

ционные отличия в структуре белка за счет наличия аффинного домена, также показали высокий уровень нейтрализации с этим МКА (табл. 2).

По-видимому, все препараты имеют близкую антигенную специфичность и общий антигенный сайт взаимодействия с МКА А001, совпадающий или перекрывающийся с участком белковой последовательности, отвечающим за проявление биологической активности. При добавлении к исследованным вариантам ИФН- $\alpha$ -2 другого МКА А004 нейтрализующего эффекта на противовирусную активность не выявлено вследствие иной локализации антигенного сайта.

### **Экспрессия генов в клетках аденокарциномы толстой кишки НСТ-116 и фибробластах лёгкого эмбриона человека ФЛЭЧ-977**

ИФН регулируют экспрессию нескольких сотен клеточных генов, среди которых значительное место занимают гены системы ИФН, апоптоза и клеточной пролиферации [14]. Транскрипционные программы геномов разных типов клеток имеют характерные особенности. Большой интерес представляют опухолевые клетки с нарушенными процессами регуляции пролиферации и дифференцировки, малочувствительные или резистентные к цитостатикам и препаратам ИФН. К таким относятся клетки аденокарциномы толстой кишки НСТ-116. Ранее с использованием технологии ДНК-чипов в них был сделан анализ генной экспрессии до и после обработки полиаминным препаратом [18]. Однако анализ не включал ключевые ИФН-зависимые гены. Нами впервые изучены гены, регулируемые отечественными препаратами рекомбинантных ИФН- $\alpha$ -2, что является важным для возможности их клинического использования в онкологии. В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, применяя современные технологии синтеза генов человеческих рекомбинантных белков, получены препараты ИФН- $\alpha$ -2 с конформацией свойственной человеческим белкам [5].

### **Конститутивные уровни экспрессии клеточных генов**

Результаты, представленные в табл. 3, дают оценку конститутивных уровней мРНК в опухолевых клетках аденокарциномы толстой кишки НСТ-116 по сравнению с нормальными фибробластами лёгкого эмбриона ФЛЭЧ (без обработки ИФН). Постановка экспериментов в двух типах клеток осуществлялась в одинаковых условиях с одними препаратами ИФН- $\alpha$ -2. Поэтому мы сочли возможным сравнить конститутивные уровни экспрессии генов в клетках аденокарциномы и в нормальных фибробластах по пороговым циклам амплификации (Cq), различиям  $\delta$ Cq относительно 18S рибосомальной РНК в каждом типе клеток и, используя 18S рибосомальную РНК как референс-нормализатор, оценить измененную экспрессию генов в клетках аденокарциномы НСТ по сравнению с фибробластами ФЛЭЧ (2 в степени  $\delta$ Cq). Такой вариант анализа позволяет, сопоставить экспрессию меняющихся генов относительно стабильного референс-гена. Клеткам аденокарциномы НСТ-116 присуща высокая конститутивная экспрессия протоонкогена Bcl-2, в 2000 раз превышающая уровень нормальных фибробластов ФЛЭЧ. Опухолевые клетки, в отличие от фибробластов лёгкого, характеризуются невыявляемыми уровнями транскрипции мРНК ИФН- $\beta$ -1, ИСГ15, Fas-рецептора, ИЛ6 (рис. 1), а также сниженным содержанием мРНК ИФН- $\alpha$ .

Таблица 1

Структура ПЦР-праймеров

| Название ген/мРНК   | Прямой праймер               | Обратный праймер       |
|---------------------|------------------------------|------------------------|
| ИФН- $\gamma$ *     | 5'atgaaatatacaagttatattcttgg | 5'ttactgggatgctcttcg   |
| ИФН- $\beta$ -1*    | 5'atgaccaacaagtgtctc         | 5'tcagtttcggagtgtaacc  |
| ИФН- $\lambda$ -1** | 5'catcatcttgattgccattt       | 5'tatttgaggctcgtcttagg |
| ИСГ-15*             | 5'atgttttcagataattcacattgc   | 5'ctattgtttggcccagttt  |
| РНК-аза L**         | 5'atggagccacaggggcca         | 5'aggaccagccgccaaggtcc |
| ИЛ6*                | 5'atgaactcctcaca             | 5'ctacatttgccgaagagc   |

Праймеры рассчитаны в программах \*Primer Express и \*\*Primer3 Blast.

Структура других использованных праймеров опубликована ранее [6; 7] и взята из литературы [16; 23; 25].

Таблица 2

Противовирусная активность и антигенная специфичность препаратов ИФН- $\alpha$ -2

| Препарат                   | Производитель, продуцент        | Активность МЕ/мл  | Нейтрализация активности МКА МЕ/мл (%) |
|----------------------------|---------------------------------|-------------------|--|
| Реаферон ИФН- $\alpha$ -2b | ГНЦ ВБ «Вектор» E.coli          | $2 \times 10^5$   | $10^3$ (95)                            |
| ИФН- $\alpha$ -2b-6His     | РОНЦ E.coli                     | $1,6 \times 10^5$ | $10^4$ (94)                            |
| ИФН- $\alpha$ -2b-12His    | РОНЦ E.coli                     | $10^5$            | $2 \times 10^3$ (80)                   |
| фитоИФН- $\alpha$ -2b-6His | РОНЦ растение N.benthamiana     | $6 \times 10^4$   | $4 \times 10^3$ (93,4)                 |
| ИФН- $\alpha$ -2a          | ООО «Протеиновый контур» E.coli | $10^8$            | $3 \times 10^6$ (97)                   |

Таблица 3

Сравнение конститутивных уровней экспрессии генов в клетках аденокарциномы толстого кишечника НСТ-116 и фибробластах лёгкого эмбриона человека ФЛЭЧ-977

| мРНК (кДНК)       | Cq ( $\delta$ Cq) |          | Нормализованная экспрессия в клетках НСТ $2\delta$ Cq | Кратность измененной экспрессии в клетках НСТ-116 в степени $\delta$ Cq |
|-------------------|-------------------|----------|---|---|
|                   | ФЛЭЧ              | НСТ-116  |   |   |
| 18S риб.РНК       | 20                | 28       | **  |   |
| ИФН- $\alpha$     | 27(-7)            | 37(-9)   | - 2   | Ниже в 4 раза   |
| ИФН- $\beta$ -1   | 32(-12)           | >45*     | Не выявляется   |   |
| ИФН- $\lambda$ -1 | 35(-15)           | 40 (-12) | + 3   | Выше в 8 раз  |
| ИФН- $\gamma$     | >45*              | >45*     | Не выявляется   |   |
| ОАС1              | 34(-14)           | 38(-10)  | + 4   | Выше в 16 раз   |
| Дс-ПК             | 28(-8)            | 35(-7)   | + 1   | Выше в 2 раза   |
| РНКазы L          | 29(-9)            | 35(-7)   | + 2   | Выше в 4 раза   |
| ИСГ15             | 27(-7)            | >45*     | Не выявляется   |   |
| FAS(CD95)         | 30(-10)           | >45*     | Не выявляется   |   |
| VCL-2             | 28(-8)            | 25(+3)   | + 11  | Выше в 2048 раз   |
| ИЛ4               | 29(-9)            | 33(-5)   | +4  | Выше в 16 раз   |
| ИЛ6               | 41(-21)           | >45*     | Не выявляется   |   |
| ИЛ17              | 30(-10)           | 35(-7)   | + 3   | Выше в 8 раз  |

Cq – пороговые циклы амплификации (в скобках разница  $\delta$ Cq с рибосомальной РНК).

\*Невыявляемая экспрессия генов после проведения 45 циклов амплификации.

\*\*18S РНК референс-нормализатор уровней исследованных мРНК.

Расчёты выполнены по формуле  $\delta$ Cq=CqрибРНК– CqmРНК в каждом типе клеток.  $2\delta$ Cq =  $\delta$ CqНСТ– $\delta$ CqФЛЭЧ. Кратность 2 в степени  $2\delta$ Cq.

Изменения в экспрессии этих генов объясняет причину дефектной реакции этих раковых клеток на препараты ИФН и индукторы апоптоза.

Вместе с тем, в клетках аденокарциномы повышены уровни мРНК ИФН- $\lambda$ -1, ИФН-зависимых ферментов (ОАС, дсПК и РНКазы).

Возможно, активация группы антивирусных генов в опухолевых клетках, является способом защиты их от внешних неблагоприятных воздействий патогенов.

В клетках аденокарциномы вирус ЭМК не вызывал цитопатогенного действия. Опухолевые клетки характеризуются более высокими конститутивными уровнями мРНК ИЛ4 и мРНК ИЛ17. Следует отметить, что в фибробластах человека происходила индукция 2 транскриптов гена ИЛ4, а в раковых – только одного из них, хотя и на более высоком уровне (рис. 1).

### Действие препаратов ИФН- $\alpha$ -2 на экспрессию клеточных генов

Между действием препаратов в двух линиях клеток обнаружены определенные отличия, хотя в ряде случаев на одном типе клеток у разных препаратов выявляются общие закономерности (табл. 4).

В клетках аденокарциномы толстой кишки (НСТ-116), в отличие от фибробластов лёгкого эмбриона (ФЛЭЧ-977), исследованные препараты ИФН- $\alpha$ -2 не индуцировали транскрипцию генов ИФН- $\beta$ -1, ИФН- $\gamma$ , ИСГ-15 и Fas-рецептора (табл. 4, рис. 1).

Вместе с тем препараты стимулировали гены ИФН- $\alpha$  и ИЛ4 в клетках аденокарциномы. При этом более сильным активатором гена ИФН- $\alpha$  был бактериальный ИФН- $\alpha$ -2b-6His. Реаферон, чИФН- $\alpha$ -2a и растительный фитоИФН- $\alpha$ -2b-6His повышали в опухолевых клетках транскрипцию мРНК ИФН- $\lambda$ -1.

Таблица 4

Действие рекомбинантных альфа-2-ИФН на экспрессию генов системы ИФН в клетках НСТ-116 и ФЛЭЧ-977

| Препараты $\alpha$ 2-ИФН           | Клетки | ИФН- $\alpha$ | ИФН- $\beta$ 1 | ИФН- $\gamma$ | ИФН- $\lambda$ 1 | ОАС | РНКаза | дсПК |
|------------------------------------|--------|---------------|----------------|---------------|------------------|-----|--------|------|
| Реаферон ИФН- $\alpha$ -2b         | НСТ    | 6 ↑           | 0              | 0             | 7 ↑              | 6 ↑ | 1      | 3    |
|                                    | ФЛЭЧ   | 1             | 28 ↑           | 3             | 2                | 2   | 4      | 2    |
| ИФН- $\alpha$ -2b-6His             | НСТ    | 14 ↑          | 0              | 0             | 0                | 3   | 1      | 2    |
|                                    | ФЛЭЧ   | 0,4           | 8 ↑            | 3             | 1                | 1   | 0,2    | 0,4  |
| ИФН- $\alpha$ -2b-12His            | НСТ    | 1             | 0              | 0             | 0                | 6 ↑ | 1      | 4    |
|                                    | ФЛЭЧ   | 1             | Ни             | 1             | 1                | 0,3 | 0,2    | 0    |
| фитоИФН- $\alpha$ -2b-6His<br>РОНЦ | НСТ    | 8 ↑           | 0              | 0             | 4                | 8 ↑ | 4      | 3    |
|                                    | ФЛЭЧ   | 1             | 2              | 0,1           | 0,1              | 0,4 | 1      | 1    |
| ИФН- $\alpha$ -2a                  | НСТ    | 6 ↑           | 0              | 0             | 3                | 3   | 1      | 6 ↑  |
|                                    | ФЛЭЧ   | 1             | 0,1            | 10 ↑          | 1                | 0,2 | 0,2    | 0,2  |

Числовые показатели – кратность относительно контроля принятого равным 1 (2 в степени  $\delta$ Сq опыт –  $\delta$ Сq контроль). ↑ показаны наиболее значимые эффекты стимуляции. Ни – не исследован.

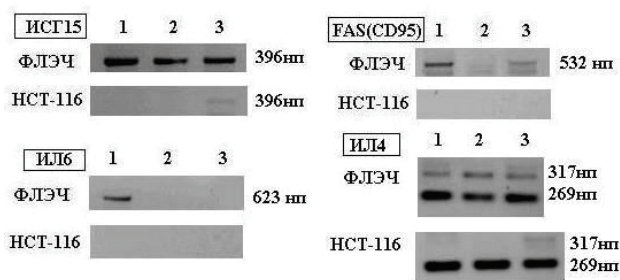


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР. Клетки обработаны:

- 1 – Реаферон ИФН- $\alpha$ -2b,
- 2 – Бактериальный ИФН- $\alpha$ -2b-6His,
- 3 – Контроль (необработанные ИФН).

Все препараты активировали ген дсПК в клетках аденокарциномы. Индукция экспрессии этого протеинкиназного гена, участвующего в апоптозных реакциях, по имеющимся данным, повышает чувствительность клеток рака молочной железы к цитостатическому действию химиопрепарата доксирубицин [9]. В обоих типах клеток отсутствует конститутивная экспрессия гена ИФН- $\gamma$  (табл. 3), но добавление к фибробластам человека препарата ИФН- $\alpha$ -2a вызывает его стимуляцию (табл. 4). Подобного активирующего действия на ген ИФН- $\gamma$  в опухолевых клетках НСТ не наблюдается. Растительный ИФН сильнее других повышал транскрипцию мРНК ОАС1 и активировал ген РНКазы L в опухолевых клетках. Препараты ИФН- $\alpha$ -2b подавляли экспрессию гена Bcl-2 в опухолевых клетках НСТ-116 (рис. 2, Б).

Максимальный ингибирующий эффект (более чем в 100 раз) показал рекомбинантный белок, полученный из растительного продуцента фитоИФН- $\alpha$ -2b-6His.

Растительный продуцент обладает рядом преимуществ. В отличие от бактериальной системы экспрессии, в клетках высших растений осуществляются пострасляционные модификации, сходные с таковыми в клетках млекопитающих: гликозилирование, фосфорилирование, метилирование и др., а также обеспечивается правильная укладка (фолдинг) рекомбинантного продукта, обеспечивающая сохранение белка растворимым [3; 19]. При использовании растений мы получаем белок, гликозилированный по типу близкому к млекопитающим [13]. Мы предполагаем, что такой подход увеличит стабильность белка и снизит гуморальный ответ иммунной системы человека на введение высоких доз рекомбинантного ИФН-препарата.

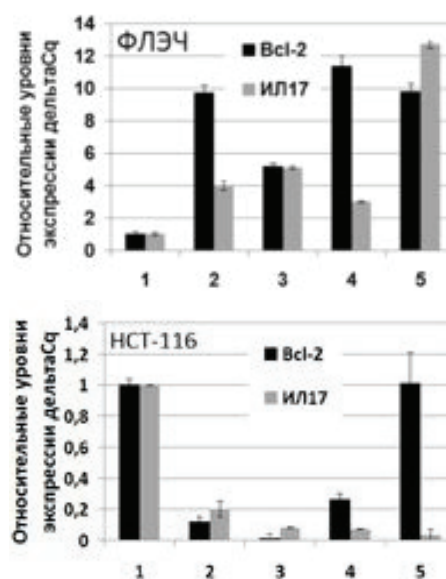


Рис. 2. Регуляция ИФН- $\alpha$ -2 экспрессии генов BCL-2 и IL17 в клетках ФЛЭЧ (А) и НСТ-116 (Б).

По оси ординат – относительные уровни экспрессии генов.

По оси абсцисс – указаны типы клеток и исследуемые гены.

- 1 – Контроль (равен 1);
- 2 – Реаферон ИФН- $\alpha$ -2b;
- 3 – Растительный фитоИФН- $\alpha$ -2b-6His;
- 4 – Бактериальный ИФН- $\alpha$ -2b-6His;
- 5 – Бактериальный ИФН- $\alpha$ -2a

В фибробластах лёгкого эмбриона человека (линия ФЛЭЧ-977) препараты ИФН- $\alpha$ -2 не влияли на гены своего семейства, но индуцировали транскрипцию генов других видов ИФН (ИФН- $\beta$ -1 и ИФН- $\gamma$ ). Подобной активации не происходило в опухолевых клетках. Сильный стимулирующий эффект на ген ИФН- $\gamma$  оказывал ИФН- $\alpha$ -2a. В фибробластах человека и опухолевых клетках эффект препаратов ИФН на протоонкоген Bcl-2 и ген IL17 был противоположным. В нормальных фибробластах интерфероны индуцировали их экспрессию, а в опухолевых клетках наоборот – подавляли (рис. 2, А, Б).

Ранее полуколичественным методом ОТ-ПЦР была получена характеристика клеток карциномы простаты DU145 в отношении экспрессии генов системы интерферона и апоптоза [8]. Показано положительное действие отечественных рекомбинантных препаратов ИФН- $\alpha$ -2 (Альфараон) и ИФН- $\gamma$  (Ингарон), а также двуспиральной (дс)РНК

(Ридостин) и синтетического комплекса поли(И)-поли(Ц) на уровне транскрипции генов клеточной защиты и продукцию некоторых интерлейкинов.

Результаты анализа в ИФН-обработанных клетках карциномы простаты DU145 во многом совпадают с полученными на клетках аденокарциномы толстого кишечника HCT-116. Наблюдалась стимуляция синтеза мРНК ИФН- $\alpha$ , дсРНК-протеинкиназы, OAS1 и РНК-азы L и подавление мРНК протоонкогена Bcl-2. Полученные на двух типах опухолевых клеток (DU145 и HCT-116) данные указывают на необходимость продолжения исследований с отечественными препаратами рекомбинантных ИФН и дсРНК.

### Заключение

Клетки аденокарциномы толстой кишки HCT-116 характеризуются отсутствием экспрессии ряда генов системы ИФН (ИФН- $\beta$ -1, ИФН- $\gamma$ , ИСГ-15) и сигнальных регуляторов апоптоза (Fas-рецептора и ИЛ6).

### Литература

1. *Ершов Ф.И., Киселёв О.И.* Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) – М.: Гэотар Медицина, 2005. – 368 с.
2. *Ершов Ф.И.* Антивирусные препараты. Справочник (2-е изд.) – М.: Геотар Медицина, 2006. – 312 с.
3. *Зверева А.С., Петровская Л.Е., Родина А.В. и др.* Экспрессия миелоцитокинов человека в растении // Биохимия. – 2009. – 74, вып. 11. – С. 1459–68.
4. *Кособокова Е.И., Косоруков В.С.* Интерфероны в онкологии // Врач. – 2010. – №11. – С. 18–21.
5. *Кособокова Е.И., Косоруков В.С.* Исследование влияния поли-His доменов на уровень экспрессии и эффективность очистки Интерферона- $\alpha$ -2b человека // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 107–12.
6. *Соколова Т.М., Урываев Л.В.* Способ определения цитокинового статуса на генетическом уровне. Патент на изобретение №2181773, 27 апреля 2002 г.
7. *Соколова Т.М., Бибикова О.В., Быстров Н.С., Урываев Л.В.* Экспрессия генов системы интерферона и клеточного апоптоза в пробах крови человека // Вопросы вирусологии. – 2005. – №1. – С. 19–21.
8. *Соколова Т.М., Соколова З.А., Рубцова М.А., Барышников А.Ю.* Экспрессия интерферонзависимых и апоптозных генов в клетках карциномы простаты DU145: влияние препаратов интерферонов и их индукторов – двуспиральных РНК // Российский биотерапевтический журнал – 2010. – Т 9, №1. – С. 53–6.
9. *Bennett R.L., Carruthers A.L., Hui T. et al.* Increased expression of the dsRNA-activated protein kinase PKR in breast cancer promotes sensitivity to doxorubicin // Plos one. – 2012. – 7(9). – e46040.
10. *Chen J., Baing E., Fish E.N.* Diversity and relatedness among the type I interferons // J. Interferon a. Cytokine Res. – 2004. – 24. – P. 687–98.
11. *Christian S.L., Dong Zu, Licursi M. et al.* Suppression of IFN-induced transcription underlies IFN-defects generated by activated Ras/MEK in human cancer cells // Plos one. – 2012. – 7(9) – t44267.
12. *Crichley-Torrie R.J., Simons D.L., Yan N. et al.* Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2009. – 106(22). – P. 9010–5.
13. *De Leede L.G., Humphries J.E., Bechet A.C. et al.* Novel controlled-release Lemna-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial // J. Interferon a. Cytokine Res. – 2008. – 28(2). – P. 113–22.
14. *De Veer M. J., Holko M., Frevel M. et al.* functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays // J. Leukoc. Biol. – 2001. – 69. – P. 912–20.
15. *George P.M., Badiger R., Alazawi W. et al.* Pharmacology and therapeutic potential of interferons // Pharmacology a. Theuraeputics. – 2012. – 135. – P. 44–53.
16. *Hamzaoul A., Brahim M.B.* Inflammatory response in induced sputum mononuclear cells from patients with acute exacerbation asthma // Mediators of Inflammation. – 2000. – 9(3–4). – P. 147–55.
17. *Hilkens C.M., Sohraak J.F., Kerr I.M.* Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells // J. Immunol. – 2003. – 171. – P. 5255–363.
18. *Ignatenko N.A., Yerushalmi H.F., Pandey R. et al.* Gene expression analysis of HCT-116 colon tumor-driven cells with polyamine analog PG-11047 // Cancer genomics a. Proteomics. – 2009. – 6. – P. 161–76.
19. *Komarova T.V., Baschieri S., Donini M. et al.* Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals // Expert Rev Vaccines. – 2010. – 9(8). – P. 859–76.
20. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDeltaC(T)) // Methods – 2001. – 25. – P. 402–8.
21. *Pitha I.F., Pitha P.M.* Viral defense carcinogenesis and ISG15: Novel roles for old ISG // Cytokine Growth Factor Rev. – 2007. – 18(5–6). – P. 409–17.
22. *Platanias L.C.* Mechanisms of type I- and type-II- interferon-mediated signaling // Nat. Rev. immunol. – 2005. – 5. – P. 375–86.
23. *Rho H.W., Lee B.C., Choi E.S.* Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR // BMC Cancer. – 2010. – 10. – P. 240–53.
24. *Sandler A.J., Williams B.R.G.* Interferon inducible antiviral effectors // Nat. Rev. immunol. – 2008. – 8(7). – P. 559–68.
25. *Wainwright D.A., Sengupta S., Han Y. et al.* The presence of IL-17A and T helper 17 cells in experimental mouse brain tumors and human glioma // Plos one. – 2010. – 5(10). – P. 1–7.

### СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

|     |                             |
|-----|-----------------------------|
| ИФН | – интерферонов              |
| ИСГ | – ИФН-стимулированного гена |
| ЦПД | – цитопатогенного действия  |
| ЭМК | – энцефаломиокардит мышей   |

УДК 616-006.04-092.9:615.831

Г.А. Меерович<sup>1</sup>, С.Ш. Каршиева<sup>2</sup>, И.Г. Меерович<sup>2</sup>, М.С. Белов<sup>3</sup>, А.В. Фабер<sup>3</sup>, В.Б. Лощенов<sup>1</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>4</sup>**ПОВЫШЕНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ “ФОТОСЕНСА™”****ПРИ СОВМЕСТНОМ ВВЕДЕНИИ С ПВП**<sup>1</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва<sup>3</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, Москва<sup>4</sup>Государственный Научный Центр «НИОПИК», Москва**Контактная информация**

Меерович Геннадий Александрович, канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории лазерной биоспектроскопии

адрес: 119991, Москва, уд. Вавилова, 38; тел. +7(903)798-93-00

e-mail: [meerovich@mail.ru](mailto:meerovich@mail.ru)

Статья поступила 19.06.2013; принята к печати 09.07.2013.

**Резюме**

Рассмотрена возможность повышения эффективности ФДТ с фотосенсибилизатором “Фотосенс™” при совместном внутривенном введении с Гемодезом (водно-солевой р-р ПВП). Проведены исследования влияния ПВП на агрегацию “Фотосенса™”, селективность его накопления в опухоли и фотодинамическую эффективность. Показано, что ПВП способствует повышению эффективности ФДТ с этим фотосенсибилизатором на модельных опухолях, предположительно за счет уменьшения агрегации молекул “Фотосенса™”.

**Ключевые слова:** поливинилпирролидон, фотодинамическая терапия, опухоль, “Фотосенс™”, агрегация, селективность.

*G.A. Meerovich<sup>1</sup>, S.Sh. Karshieva<sup>2</sup>, I.G. Meerovich<sup>2</sup>, M.S. Belov<sup>3</sup>, A.V. Faber<sup>3</sup>, V.B. Loschenov<sup>1</sup>, E.A. Lukyanets<sup>4</sup>***ENHANCEMENT OF PHOTODYNAMIC EFFICIENCY OF “PHOTOSENS™”****BY COMBINATION WITH POLYVINYLPIRROLIDONE**<sup>1</sup>A.M. Prokhorov General Physics Institute of RAS, Moscow<sup>2</sup>FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow<sup>3</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow<sup>4</sup>State Research Center «NIOPIK», Moscow**Abstract**

This work studies the possibility to enhance efficiency of photodynamic treatment of photosensitizer Photosens by its combined administration with Hemodes (saline/buffered solution of polyvinylpyrrolidone). Performed studies of influence of polyvinylpyrrolidone on Photosens aggregation processes, selectivity of its accumulation in tumor and photodynamic action showed that increase of treatment efficiency in this combination, supposedly due to deaggregation of the photosensitizer molecules.

**Key words:** polyvinylpyrrolidone, photodynamic therapy, tumor, Photosens, aggregation, selectivity.

**Введение**

ФС “Фотосенс™”, представляющий собой р-р смеси натриевых солей ди-, три- и тетрасульфоталозианина гидроксиалюминия со средней степенью сульфирования, близкой к 3, в воде или физ. р-ре<sup>1</sup> [1], широко используется для фотодинамического лечения опухолей [3]. Задача дальнейшего совершенствования ФДТ с “Фотосенсом™” связана с поиском путей повышения его фотодинамической эффективности.

Одним из факторов, снижающих фотодинамическую эффективность ФС, по крайней мере, в первые часы после введения, когда основная часть ФС находится еще в кровеносном русле, является агрегация их молекул [4].

Для уменьшения влияния агрегации на фотодинамическую эффективность ФС на основе хлорина е6 [2] было предложено добавить в водный р-р этой субстанции ПВП, что позволило повысить эффективность ФДТ с этим фотосенсибилизатором

(препарат “Фотолон™”) на модельных опухолях. Аналогичный результат был получен для гиперичина [6].

В нашей работе рассмотрена возможность повышения эффективности ФДТ с использованием фотосенсибилизатора “Фотосенс™” при совместном внутривенном введении с ПВП.

**Материалы и методы**

Исследуемые водные композиции на основе фотосенсибилизатора “Фотосенс™” (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»», Москва) представляли собой р-ры “Фотосенса™” в физ. р-ре и в водно-солевом р-ре Гемодез, содержащем 6% низкомолекулярного ПВП Мм 12 600±2 700; хлориды натрия, калия, кальция, магния; гидрокарбонат натрия («Биосинтез», Пенза).

В опытах использовали мышей линии Balb/c (самки) массой тела 23 г из вивария ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Животных содержали в виварии в условиях с естественным освещением на брикетированном корме и постоянном доступе к воде. Перед лечением мышей рандомизированно

<sup>1</sup>Здесь и далее – 0,9 %-ный р-р NaCl в дистиллированной воде.

распределяли по группам ( $n=5$ ), оставляя одну группу без лечения в качестве контрольной ( $n=6$ ).

Использовали перевиваемую ELD после 3 пассажа. Для опытов асцитическую жидкость из брюшной полости привитых животных, содержащую клетки ELD, разводили в среде 199 до концентрации  $1,5 \times 10^6$  клеток в 0,1 мл. Полученную взвесь инокулировали внутримышечно в голень правой задней лапы мышей. Лечение начинали на +6 сутки, когда опухоли объем у животных в среднем достигал около 700 мм<sup>3</sup>. ФС вводили в/в в дозе 1,5 мг/кг массы тела.

Исследования проводили спектрально-флуоресцентным методом с использованием волоконного спектроанализатора ЛЭСА-06-Биоспек («Биоспек», Россия), флуоресценция возбуждалась He-Ne лазером с  $\nu$  632,8 нм.

Для спектрально-флуоресцентных исследований рандомизированно формировали группы мышей для каждого ФС (по 3 особи в группе) Спектры флуоресценции в разные моменты времени после введения ФС изучались в нескольких (5–10) точках опухоли и, соответственно, нормальной ткани на контралатеральной зоне левой лапки. Полученные данные усреднялись по этим точкам с использованием программы «UnoMomento» («Биоспек», Россия). Уровень содержания ФС в опухоли и нормальной ткани оценивался в относительных единицах по значениям интегральной интенсивности флуоресценции, нормированной на интенсивность рассеянной лазерной линии. Эти данные для опухоли и нормальной ткани усреднялись для всех мышей группы. По усредненным данным оценивалось в динамике содержание ФС в опухоли и нормальной ткани, а по соотношению этих величин – селективность накопления «Фотосенса™» в опухоли по отношению к нормальной ткани.

Для облучения при ФДТ использовали лазер ЛФД-01/675-Биоспек («Биоспек», Россия) с  $\nu$  излучения 670 нм. Эффективность ФДТ мышей с ELD оценивали по стандартным критериям – ТРО и УПЖ. Полученные данные статически обрабатывали по методу Фишера-Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова, рассчитывая ДИ средних сравниваемых величин. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Исследование поглощения и флуоресценции

#### изучаемых растворов «Фотосенса™»

Исследования формы спектра поглощения «Фотосенса™», растворенного в физ. р-ре, свидетельствуют о том, что при высокой концентрации значительная часть молекул «Фотосенса™» находится в агрегированном состоянии, предположительно – в виде фотодинамически неактивных димеров (рис. 1). В частности, в спектрах поглощения при высоких концентрациях появляется дополнительный пик в области 600–620 нм, интенсивность которого нарастает при повышении концентрации ФС.

Исследования зависимости интенсивности флуоресценции и поглощения от концентрации «Фотосенса™» были проведены в растворах с Интралипидом™, моделирующим рассеяние биологической ткани [5; 7].

Исследования позволили установить для фиксированных условий эксперимента количественное соотношение между интегральной интенсивностью флуоресценции «Фотосенса™», нормированной на

интенсивность рассеянной лазерной линии, а также его поглощением, с одной стороны, и концентрацией «Фотосенса™» – с другой. Эта взаимосвязь была использована в исследованиях *in vivo* для количественной оценки содержания «Фотосенса™» в опухоли. В частности, это позволило установить, что при введении в дозе 1,5 мг/кг, которая использовалась в настоящем исследовании, содержание «Фотосенса™» в опухоли в различные моменты первых суток после введения находилось в пределах  $(1,6-6) \times 10^{-3}$  мг/мл. При этом необходимо также иметь в виду, что непосредственно после введения, когда весь «Фотосенс™» находится в сосудах, его концентрация в крови близка к  $20 \times 10^{-3}$  мг/мл.

Результаты эксперимента показали (рис. 2): зависимость интенсивности флуоресценции и поглощения от концентрации «Фотосенса™» при больших ее значениях носит сублинейный характер. Это позволяет сделать вывод о значимом влиянии агрегации на квантовый выход флуоресценции (концентрационном тушении) и экстинкцию «Фотосенса™».

В растворе на основе Гемодеза влияние агрегации на свойства «Фотосенса™» заметно ниже, чем при разбавлении «Фотосенса™» физ. р-ром, то есть, присутствие ПВП способствует дезагрегации молекул «Фотосенса™».

Существенное влияние агрегации на свойства «Фотосенса™» и наблюдаемая разница между свойствами изучаемых растворов при его высокой концентрации позволяет предположить, что агрегация значимо влияет и на его фотодинамическую эффективность, а дезагрегация, обусловленная присутствием ПВП, позволит повысить эффективность ФДТ «Фотосенса™». Для подтверждения этого предположения были проведены исследования *in vivo*.

### Исследования *in vivo*

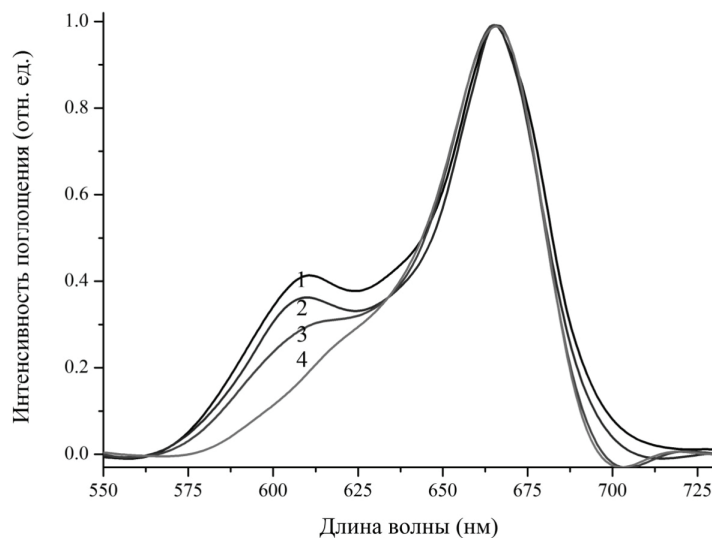
Изучение *in vivo* динамики интенсивности флуоресценции «Фотосенса™» показало (рис. 3): в группе мышей, которым «Фотосенс™» вводили в р-ре Гемодеза, на начальном этапе (в течение первых 10–15 ч после введения) интенсивность флуоресценции и в опухоли и в нормальной ткани была существенно (~ в 1,5 раза) выше по сравнению с таковой в группе животных, которым вводили «Фотосенс™» в физ. р-ре.

Через 24 ч после введения интенсивность флуоресценции в опухоли начинала медленно спадать примерно с одинаковым клиренсом для обеих групп. В нормальной ткани клиренс был выше в группе, которой «Фотосенс™» вводили в р-ре Гемодеза, что позволило к +8 суткам существенно (~ в 2 раза по сравнению с «Фотосенсом™», введенным в физ. р-ре) снизить остаточную концентрацию «Фотосенса™» в коже (рис. 4).

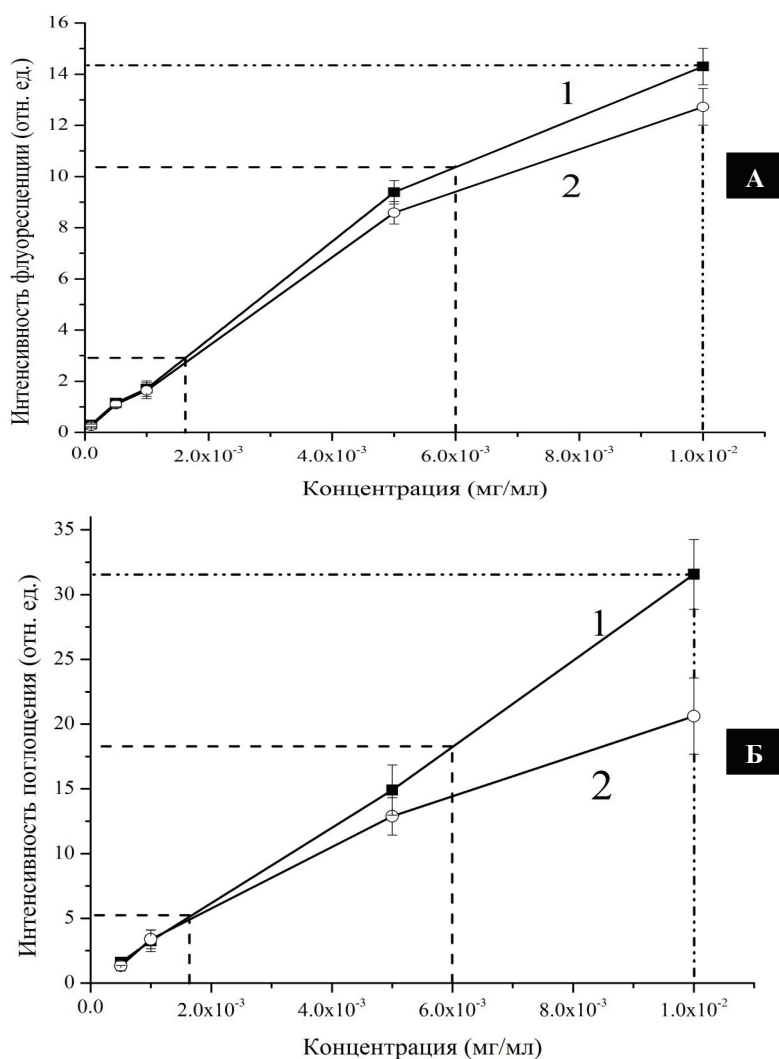
Селективность накопления «Фотосенса™» в опухоли по сравнению с таковым в нормальной ткани была выше на 40–50 % при введении в р-ре Гемодеза, чем при введении в физ. р-ре (рис. 5).

По нашему мнению, ПВП в р-ре «Фотосенса™» с Гемодезом оказывает двухфакторное влияние на интенсивность флуоресценции. С одной стороны, как следует из наших предыдущих экспериментов с р-рами «Фотосенса™», ПВП способствует его дезагрегации, что повышает флуоресцентную эффективность ФС.

С другой – Гемодез усиливает почечный кровоток и способствует более быстрому выведению «Фотосенса™» из тканей с нормальным кровообращением, то есть из здоровых тканей.



**Рис. 1.** Нормированные на максимум спектры поглощения “Фотосенса™” в физ. р-ре с различными концентрациями (мг/мл):  
 1 –  $10^{-2}$ ;  
 2 –  $5 \times 10^{-3}$ ;  
 3 –  $10^{-3}$ ;  
 4 –  $5 \times 10^{-4}$ .

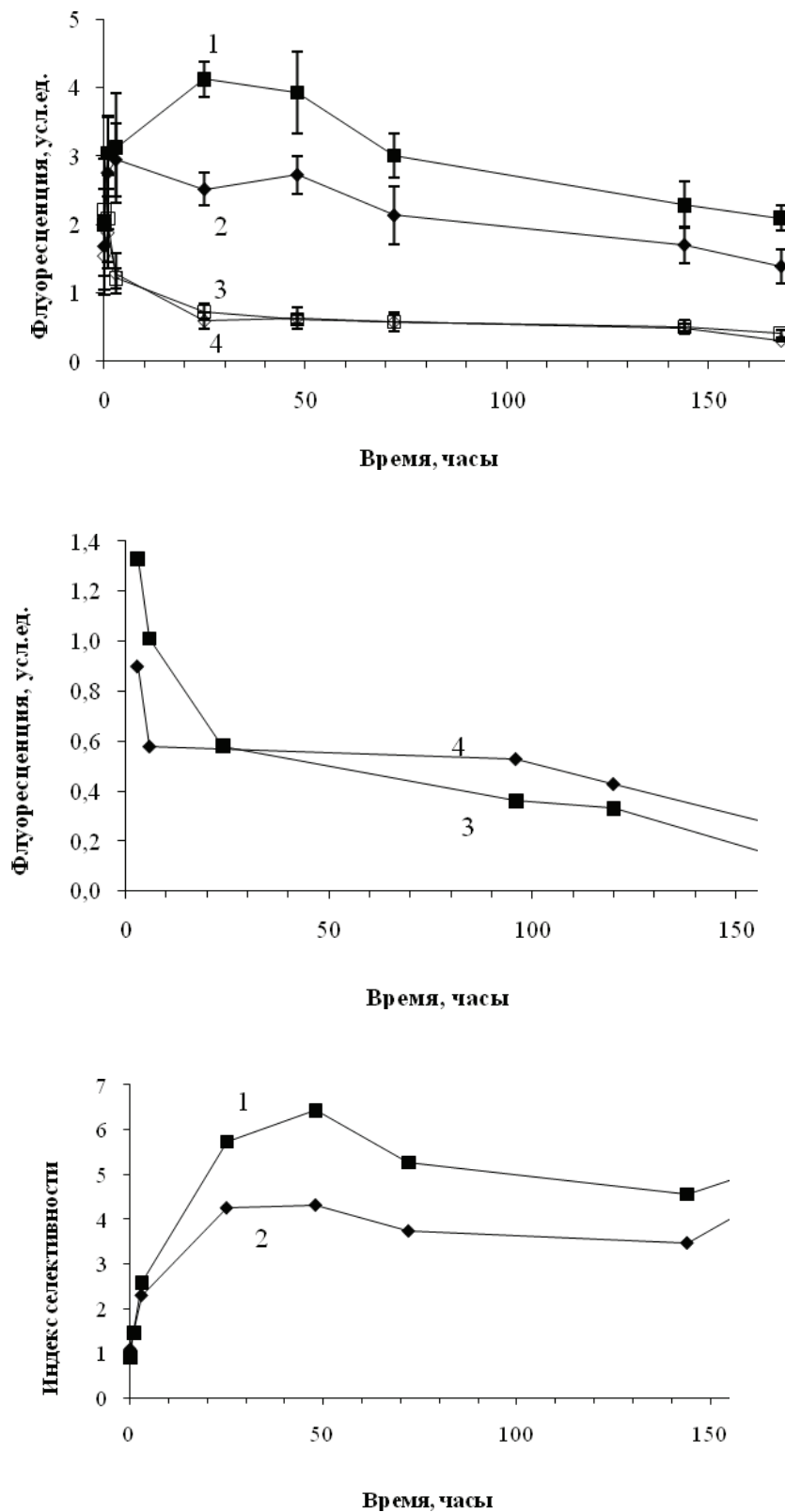


**Рис. 2.** Зависимость интенсивности флуоресценции (А) и поглощения (Б) от концентрации “Фотосенса™”:

Область, ограниченная штриховыми линиями, соответствует экспериментально определенному *in vivo* диапазону средней по опухоли концентрации “Фотосенса™” в различные моменты первых суток. Штрихпунктирная линия соответствует максимальной концентрации “Фотосенса™” в крови мышей сразу после введения.

1 – “Фотосенса™” в р-ре Гемодез;  
 2 – “Фотосенса™” в физ. р-ре.





**Рис. 3.** Динамика накопления «Фотосенса™» (А; Б) в опухоли (1; 2) и нормальной ткани (3; 4) и селективность (В) накопления в опухоли по сравнению с нормальной тканью при введении в р-ре Гемодеза (1; 3) и физ. р-ре (2; 4).

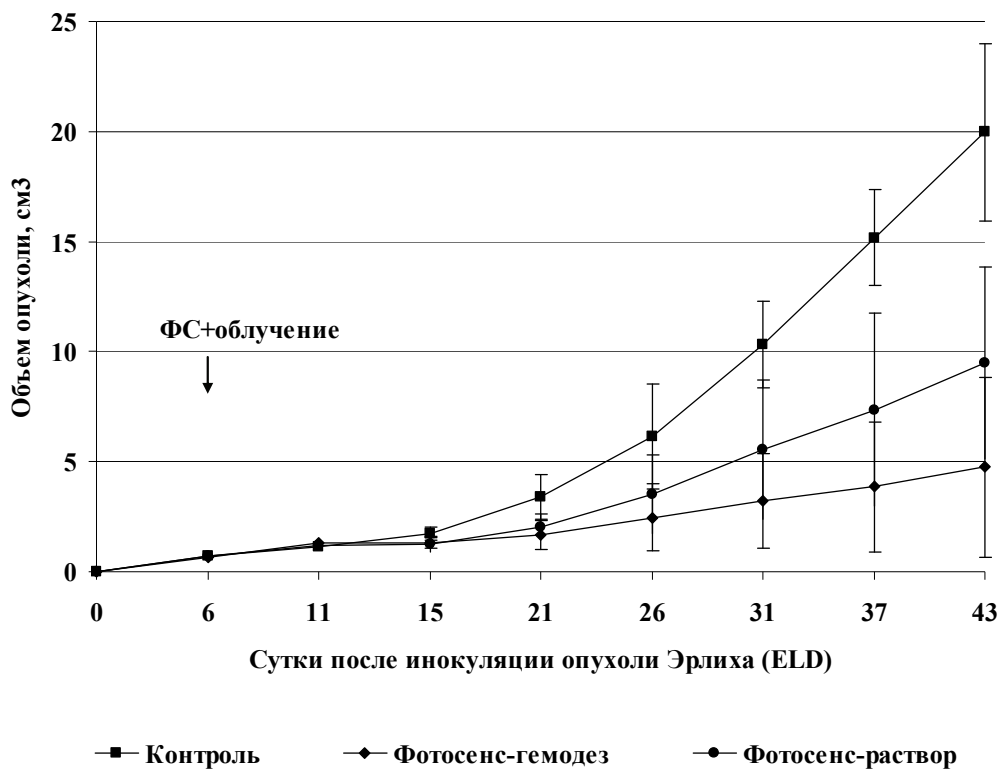


Рис. 4. Динамика роста аденокарциномы Эрлиха (ELD):

1 – без лечения;

2 – после ФДТ с использованием “Фотосенса™” в физиологическом растворе;

3 – после ФДТ с использованием “Фотосенса™” в растворе Гемодез.

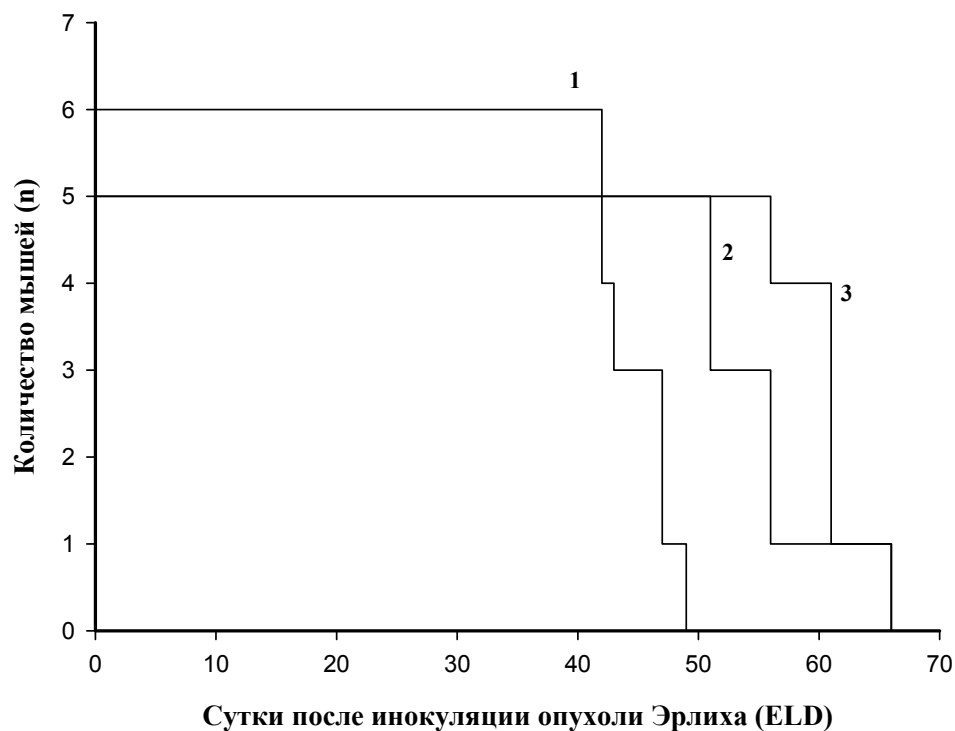
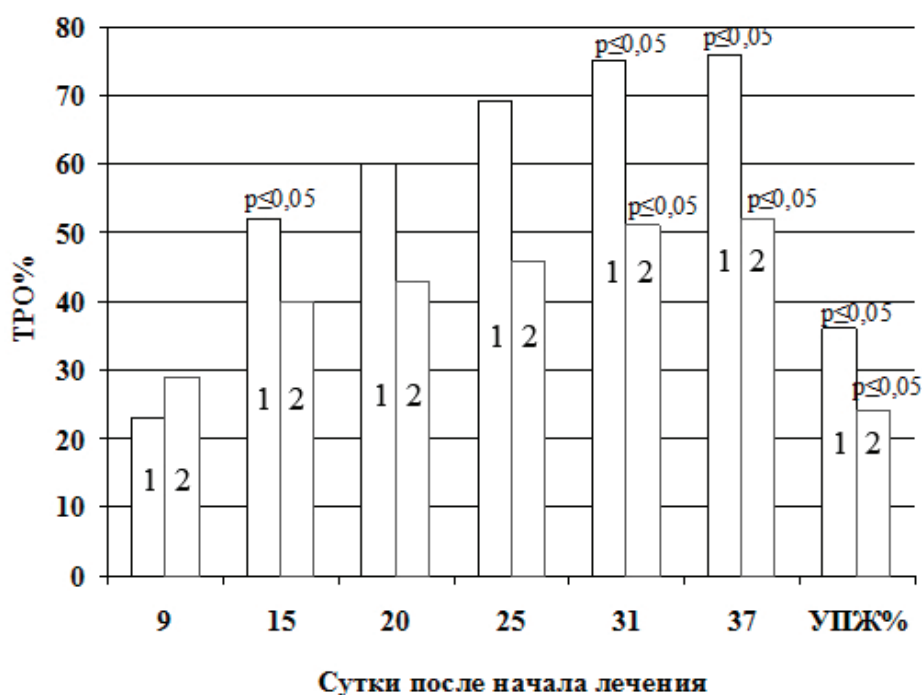


Рис. 5. Продолжительность жизни мышей с ELD в контрольной группе (1), после ФДТ с использованием “Фотосенса™” в физ. р-ре (2) и “Фотосенса™” в р-ре Гемодеза (3).



**Рис. 6.** Эффективность фотодинамической терапии ELD с использованием “Фотосенса™” в р-ре Гемодез (1) и “Фотосенса™” в физ. р-ре (2).

Это обеспечивает и более высокий уровень флуоресценции “Фотосенса™” на начальном этапе, и более быстрое выведение “Фотосенса™” из нормальной ткани в течение всего времени, что повышает селективность накопления.

При исследованиях терапевтической эффективности ФДТ облучение проводили через 3–4 ч после введения с плотностью мощности 220 мВт/см<sup>2</sup> в течение 15 минут.

ELD в наших исследованиях характеризовалась медленным ростом – длительность латентной фазы роста составила 15 дней, а экспоненциальной – 28. Скорость роста опухоли, которая оценивалась по времени удвоения опухолей (Td), в экспоненциальной фазе составила 8 дней. СПЖ в контрольной группе составила 45 дней (рис. 4).

В группе мышей после ФДТ с использованием “Фотосенса™” в р-ре Гемодеза время удвоения объема опухолей в экспоненциальной фазе роста увеличилось почти в 2 раза и составило 15 дней. Значимое ТРО опухоли наблюдалось на +15 сутки = 52 % (p ≤ 0,05). Далее в течение следующих 28 дней ингибирующий эффект постоянно рос и на последних сроках достигал высоких и достоверных значений – ТРО = 76 % (p ≤ 0,05) (рис. 4–6). СПЖ в группе составила 61 день (рис. 5), продолжительность жизни увеличивалась на 36 % (p ≤ 0,05).

В группе мышей после ФДТ с использованием “Фотосенса™” в физ. р-ре время удвоения опу-

холей в экспоненциальной фазе роста практически не отличалось от контрольного (Td=9). С 9 по 25 сутки ингибирующий эффект слабо выражен, ТРО не превышало 46 %. К концу наблюдения эффект увеличивался, ТРО достигал достоверного и значимого значения 52 % (p ≤ 0,05) (рис. 6). СПЖ в группе составила 56 дней (рис. 5), продолжительность жизни увеличивалась на 24 % (p ≤ 0,05).

Таким образом, при выбранных условиях проведения ФДТ использование “Фотосенса™”, разбавленного физ. р-ром, для ФДТ мышей с ELD дает невысокий кратковременный противоопухолевый эффект без существенного увеличения продолжительности жизни.

В то же время применение “Фотосенса™”, разведенного в Гемодезе, позволять получить длительный высокий противоопухолевый эффект в отношении первичного узла ELD со значимым увеличением продолжительности жизни мышей.

### Выводы

Совместное внутривенное введение фотосенсибилизатора “Фотосенса™” с ПВП повышает эффективность ФДТ, предположительно – за счет уменьшения агрегации молекул “Фотосенса™”, а также способствует повышению селективности накопления “Фотосенса™” в опухоли по сравнению с нормальной тканью и более быстрому выведению “Фотосенса™” из здоровых тканей.

### Литература

1. Ворожцов Г.Н., Дмитриева Н.Д., Зелихина В.А. и др. Способ получения субстанции фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии. Патент РФ № 2220722, опублик. 10.01.2004.
2. Трухачева Т.В., Шляхтин С.В., Исаков Г.А., Истомин Ю.П. Фотолон – новое средство для фотодинамической терапии. Обзор результатов фармацевтических, фармакологических и клинических исследований. – Минск: РУП «Белмедпрепараты», 2009 г. – 64 с.

3. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в клинической онкологии. – Под ред. В.И. Чиссова, Е.В. Филоненко. – М.: «Триумф», 2012. – 269 с.
4. *Edrei R., Gottfried V., van Lier J.E., Kimel S.* Sulfonated phthalocyanines: photophysical properties, *in vitro* cell uptake and structure–activity relationships // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 1998. – 2(3). – P. 191–284.
5. *Flock S.T., Jacques S.L., Wilson B.C. et al.* Optical Properties of Intralipid: A phantom medium for light propagation studies // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 1992. – 12. – P. 510–9.
6. *Vanderpitte J., Roelants M., van Cleynebreugel B. et al.* Biodistribution and photodynamic effects of polyvinylpyrrolidone-hypericin using multicellular spheroids composed of normal human urothelial and T24 transitional cell carcinoma cells // *Journal of Biomedical Optics*. – 2011. – 16(1). – P. 018001–6.
7. *van Staveren H.G., Moes C.J.M., van Marle J. et al.* Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400–1100 nanometers // *Applied Optics*. – 1991. – 30. – P. 4507–14.

### СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

|     |                                      |
|-----|--------------------------------------|
| ДИ  | – доверительный интервал             |
| ПВП | – Поливинилпирролидон                |
| СПЖ | – средняя продолжительность жизни    |
| ТРО | – торможение роста опухоли           |
| УПЖ | – увеличения продолжительности жизни |
| ФС  | – фотосенсибилизатор                 |
| ELD | – перевиваемая аденокарцинома Эрлиха |

*Е.В. Бочаров, В.Г. Кучеряну, О.А. Бочарова, А.Ю. Барышников*

#### **ВЛИЯНИЕ ФИТОАДАПТОГЕНА ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ НА СОМАТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ВЫСОКОРАКОВЫХ МЫШЕЙ СВА**

*ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва*

*ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва*

**Задача исследования.** Оценить соматическое состояние мышей линии *СВА*, предрасположенных к возникновению спонтанных гепатокарцином, при профилактическом воздействии комплексного фитоадаптогена фитомикса-40.

**Материалы и методы.** Фитомикс-40 – стандартизованный препарат, включающий компоненты 40 растительных экстрактов; обладает иммуномодулирующим, адгезиогенным, интерферогенным, антимутагенным, антиоксидантным, радиопротекторным эффектами. В работе использовали 140 мышей-самцов линии *СВА*: 1 группа ( $n=70$ ) – контрольная, мыши получали в качестве питья воду; 2 группа ( $n=70$ ) – опытная, мыши получали фитомикс-40 с питьевой водой в профилактическом режиме в течение 1-го месяца постнатального развития, включая критический период дифференцировки ткани печени. В позднем онтогенезе оценивали вес животных, их двигательную активность, наличие алопеции. Двигательную активность определяли в тесте «открытого поля» в автоматическом режиме с помощью системы Opto-Varimex-3.

**Результаты.** Вес мышей в опытной группе в возрасте 22 месяцев был выше, чем в контрольной ( $34,6 \pm 0,5$  г и  $24,4 \pm 0,2$  г соответственно,  $p < 0,01$ ). Это сочеталось с подавлением у мышей опытной группы уровня сывороточных интерлейкинов -6 и -10, которые могут негативно регулировать патогенез кахексии животных, снижая сывороточный уровень С-реактивного белка и предотвращая при этом расщепление мышечных белков. Мыши опытной группы так же имели полноценный шерстный покров. Снижение сывороточного уровня ИЛ-6 в этой группе может препятствовать потере шерсти в результате стимуляции функциональной активности волосяных фолликулов при подавлении воспалительного процесса в кожном покрове. У мышей контрольной группы в 16,6% случаев наблюдалась алопеция. Показатели двигательной активности (пройденный путь, время без движения, число «стоек», число мелких движений) у мышей опытной группы были достоверно выше, чем в контроле. Полученные результаты сочетались со снижением уровня спонтанного опухолеобразования и более высокой продолжительностью жизни у опытных животных.

**Выводы.** Профилактическое применение комплексного фитоадаптогена способствовало улучшению соматического состояния высококарактовых мышей *СВА* на фоне снижения уровня спонтанного опухолеобразования.

УДК 616-006.04-092.9:577.175.14

*О.А. Бочарова, Р.В. Карпова, В.А. Ильенко, Е.В. Бочаров, И.В. Казеев***ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНТЕГРИНЫ****ПРИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ МЫШЕЙ ВЫСОКОРАКОВОЙ ИНБРЕДНОЙ ЛИНИИ СВА***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация***Ольга Алексеевна Бочарова, д-р биол. наук, профессор, заведующая лабораторией иммунофармакологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(499)324-55-26**e-mail:** [imufarm@rambler.ru](mailto:imufarm@rambler.ru)

Статья поступила 25.02.2013, принята к печати 09.07.2013

**Резюме**

Изучены нарушения экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, а также цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 у мышей высококорактовой инбредной линии СВА, генетически предрасположенных к возникновению гепатокарцином. Исследована возможность изменений данных показателей мультифитоадаптогеном и значимость коррекции адгезивных взаимодействий иммунцитов и клеток-мишеней в восстановлении противоопухолевого надзора.

**Ключевые слова:** спонтанный гепатоканцерогенез, лейкоцитарные интегрины, цитокины, мультифитоадаптоген.

*О.А. Bocharova, R.V. Karpova, V.A. Ilyenko, E.V. Bocharov, I.V. Kazeev***LEUKOCYTE INTEGRINS IN CBA MICES****WITH HIGH RISK OF HEPATOCARCINOMAS***FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

LFA-1 and Mac-1 expression as well as serum cytokines IL-6 and IL-10 were investigated in males of inbred mice CBA genetically predisposed to spontaneous hepatocarcinomas. Correction of these parameters by multiphytoadaptogene administration was demonstrated. Data obtained suggest the significance of enhancing the adhesive interaction between immune and cancer cells for immune escape tumors mechanism reduce.

**Key words:** spontaneous hepatocarcinogenesis, leucocyte integrins, cytokines, multiphytoadaptogene.

**Введение**

Известно, что способность опухолевых клеток к неконтролируемому росту, миграции, инвазии в окружающие ткани и образованию метастазов связана с нарушениями адгезивных взаимодействий клеток между собой или внеклеточным матриксом [19; 23]. Многие современные авторы уделяют большое внимание изучению рецепторов клеточной адгезии, их роли в процессе опухолеобразования, а также исследованию препаратов, обладающих адгезиогенным эффектом. Таким образом, исследования молекул межклеточной адгезии на клеточных эффекторах иммунитета и возможности их коррекции являются актуальными.

Нарушение адгезивных взаимодействий клеток между собой и внеклеточным матриксом значимо в патогенезе злокачественного роста, ускользании опухоли от иммунологического надзора, инвазии и метастазировании [23]. На поверхности многих клеток присутствуют молекулы межклеточной адгезии (ICAM – intercellular adhesion molecules). С одной стороны, они являются гистонеспецифическими контактными молекулами интеграции клеток в тканевых системах, с другой – служат лигандами для функционально гомологичных молекул лейкоцитарных интегринов в том числе LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), обеспечивающих адгезию между иммунными эффекторами и клетками-мишенями [11]. Недостаток гистонеспецифических молекул адгезии на мембранах опу-

холевых клеток индуцирует снижение экспрессии лейкоцитарных интегринов, что приводит к ослаблению их взаимодействий, сводя к минимуму элиминацию клеток-мишеней естественными киллерами, цитотоксическими лимфоцитами и др. В частности, слабая экспрессия молекулы адгезии ICAM-1 сопровождается подавлением иммунных функций и наоборот. Это вносит определенный вклад в «ускользание» опухоли от иммунологического надзора [17; 20]. Существенной для реализации противоопухолевого эффекта представляется коррекция экспрессии лейкоцитарных интегринов [18].

Медиаторами взаимоотношений между иммунной системой и растущей опухолью являются цитокины. Многообразие биологических эффектов интерлейкинов, играющих существенную роль в пролиферации, дифференцировке, цитотоксичности иммунных клеток, межклеточных взаимодействиях, предполагает их участие в патологических процессах, в том числе в развитии и метастазировании злокачественных новообразований [16; 21; 26].

Таким образом, особенности ингибирования цитолитических потенциалов иммунных эффекторов в отношении опухолевых клеток связаны не только с нарушением рецепторного ансамбля, отвечающего за формирование конъюгатов с клеточными мишенями, но и с обязательным цитокиновым сопровождением [1; 13; 25]. Вероятно, нарушение адгезионных механизмов с участием сигнальной реактивности цитокинов при опухолевом процессе может нуждаться в соответствующей коррекции препара-

тами с адгезиогенным действием. Интерес в данном аспекте представляют фитоадаптогены, которые регулируют межклеточную адгезию, являясь индукторами дифференцировки клеток, усиливают иммунологическую реактивность организма в отношении опухолей и способствуют противоопухолевому эффекту [15; 22].

МФА представляет собой препарат на основе компонентов экстрактов сорока растений, включенных в Госфармакопею РФ, в том числе, известных адаптогенов женьшеня, родиолы, элеутерококка, лимонника, заманихи и аралии [2]. Разработаны способы его биологической и химической стандартизации [3; 10]. В предыдущих исследованиях показаны антиоксидантные, антимуtagenные, противоопухолевые, иммуномодулирующие свойства МФА [4–6].

**Целью проведенного исследования** являлось изучение экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на иммунocyтах и сывороточного уровня IL-6 и IL-10 на примере мышей высококорактовой инбредной линии СВА, генетически предрасположенных к развитию спонтанных гепатокарцином, а также возможность коррекции этих показателей МФА.

#### Материалы и методы

Работу проводили на мышax-самцах высококорактовой инбредной линии СВА (сублиния СВА/Лас У). Исходно мыши получены из ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, разведение отдела лабораторных животных ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН. Эта линия является классической моделью генетической предрасположенности к опухолям печени с высоким риском их возникновения. Дистальная хромосома 1 в клетках этих мышей несет один и более генов, обеспечивающих предрасположенность к спонтанному и химически индуцированному гепатоканцерогенезу [12]. Первые спонтанные гепатомы у мышей-самцов линии СВА возникают, начиная с 6-месячного возраста, и встречаются в 7 раз чаще, чем у самок [7; 8; 27]. В позднем онтогенезе, в возрасте 18–22 мес., в 100% случаев у самцов выявляют гепатокарциномы [9; 27]. В нашей работе использовано 170 мышей. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с международными этическими нормами. Мыши контрольной группы получали в качестве питья только воду. Водой наполняли стандартные поилки. Животные пили воду самостоятельно. Поскольку препарат является водно-спиртовым экстрактом, мышам дополнительных контрольных групп в воду добавляли раствор этанола соответствующей концентрации (3%) при разных режимах введения. Во всех контрольных группах были получены аналогичные результаты. Поэтому мы посчитали правомочным объединить эти данные в одну контрольную группу (группа 1). Мышам группы 2 (профилактическая) 10 %-ный раствор МФА добавляли в воду, которую получали самки, начиная с последних сроков беременности до отъема детенышей в возрасте 1 месяца постнатального развития. Мышам группы 3 (лечебная группа) в воду добавляли аналогичный раствор, начиная с возраста 6 мес. (курсами) до естественной гибели животного. Курс применения препарата – 2 недели, интервал между курсами – 2 недели.

В каждой группе забивали 13–15 мышей в возрасте 4; 8; 22 мес. Относительное содержание

лимфоцитов периферической крови животных с экспрессией лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a+ лимфоциты, %), Mac-1 (CD11b+ лимфоциты, %) определяли методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием наборов фирмы «BD Biosciences» (США). Реакцию учитывали на проточном цитофлуориметре FACScanto IIc («Becton Dickinson», США).

Уровень цитокинов IL-6 и IL-10 в сыворотке крови мышей определяли методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «Diacclone» (Франция). Полученные результаты анализировали с использованием статистических пакетов «STATISTICA» 6.0, ONE-WAY ANOVA.

#### Результаты и обсуждение

Результаты работы показали (табл. 1), что у мышей линии СВА в возрасте 4 и 8 мес. относительное число лимфоцитов, экспрессирующих лейкоцитарный интегрин LFA-1 (CD11a+ лимфоциты), в контрольной группе практически одинаково (47,8±2,6 % и 44,1±2,4 % соответственно). В возрасте 22 мес. этот показатель у животных снизился до 35,3±1,6 %. У мышей при профилактическом введении МФА (группа 2) изучаемый показатель к 22 месяцам понизился до 40,7±1,9 %, статистически не значимо в сравнении с контролем. Лечебное введение препарата (группа 3) выявило достоверное повышение данного показателя (42,3±2,9 %) в сравнении с контролем (см. табл. 1).

В контрольной группе мышей количество лимфоцитов, экспрессирующих лейкоцитарный интегрин Mac-1 (CD11b+ лимфоциты) к 22-месячному возрасту достоверно снизилось до 7,8±1,0 %. У опытных мышей 2 группы изучаемый показатель снизился до 11,5±1,1 %. В 3 группе параметр значимо превышал (12,8±1,7 %) уровень в контроле (табл. 2).

Как следует из данных табл. 3, в контрольных животных концентрация IL-6 в сыворотке крови к 22-месячному возрасту достоверно увеличилась до 139,1±6,6 пг/мл. Во 2 группе в животных сывороточный уровень IL-6 также достоверно повысился до 114,8±12,3 пг/мл, отставая от контроля в этот же период. Применение МФА в лечебном режиме не изменяло содержания IL-6 в животных к 22 месяцам (111,4±10,5 пг/мл), которое значимо не достигало контрольных значений в этом возрасте.

Сывороточная концентрация IL-10 в контроле к возрасту 22 мес. достоверно увеличилась. При введении МФА в профилактическом режиме уровень IL-10 не достиг контрольных значений. В группе 3 содержание IL-10 достоверно ниже по сравнению с контролем (табл. 4).

Полученные результаты показали, что у мышей-самцов высококорактовой инбредной линии СВА в онтогенезе происходит снижение экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на эффекторах иммунитета параллельно с повышением уровня IL-6 и IL-10 в сыворотке крови. Это может быть связано с развитием спонтанного гепатоканцерогенеза у этих животных, со старением или как с тем, так и с другим процессами. Применение МФА в профилактическом режиме, в раннем онтогенезе, кратковременно, захватывая «критический» период развития ткани печени (7–10 дни), способствует долговременному увеличению числа CD11a+ и CD11b+ лимфоцитов, экспрессирующих соответственно молекулы LFA-1 и Mac-1, по сравнению с контрольными животными.

Таблица 1

Воздействие мультифитоадаптогена на содержание CD11a<sup>+</sup> лимфоцитов в сыворотке крови мышей высококорактовой инбредной линии СВА

| Группы                              | CD 11a <sup>+</sup> лимфоциты (%)  |  |   |   |
|-------------------------------------|--|--|---|---|
|                                     | 4 мес  | 8 мес  | 22 мес  | p   |
| 1. Контроль                         | 47,8±2,6   | 44,1±2,4   | 35,4±1,6  | p <sub>4-8</sub> =0,31<br>p <sub>8-22</sub> =0,005<br>p <sub>4-22</sub> =0,0003 |
| 2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес.  | 50,0±4,8   | 48,1±4,8   | 40,7±1,9  | p <sub>4-8</sub> =0,77<br>p <sub>8-22</sub> =0,18<br>p <sub>4-22</sub> =0,09    |
| 3. Прием ФМ-40, начиная с 6-го мес. | 46,6±3,5   | 47,1±3,8   | 42,3±2,9  | p <sub>4-8</sub> =0,93<br>p <sub>8-22</sub> =0,33<br>p <sub>4-22</sub> =0,36    |
| p                                   | p <sub>1-2</sub> =0,67<br>p <sub>1-3</sub> =0,83<br>p <sub>2-3</sub> =0,57 | p <sub>1-2</sub> =0,45<br>p <sub>1-3</sub> =0,53<br>p <sub>2-3</sub> =0,88 | p <sub>1-2</sub> =0,09<br>p <sub>1-3</sub> =0,04<br>p <sub>2-3</sub> =0,5 | —   |

Таблица 2

Воздействие мультифитоадаптогена на содержание CD11b<sup>+</sup> лимфоцитов в сыворотке крови мышей высококорактовой инбредной линии СВА

| Группы                             | CD 11b <sup>+</sup> лимфоциты (%)  |   |   |  |
|------------------------------------|--|---|---|--|
|                                    | 4 мес  | 8 мес   | 22 мес  | p  |
| 1. Контроль                        | 15,7±1,1   | 13,6±1,2  | 7,8±1,0   | p <sub>4-8</sub> =0,21<br>p <sub>8-22</sub> =0,0008<br>p <sub>4-22</sub> =0,0001 |
| 2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес  | 19,2±2,0   | 17,5±1,9  | 11,5±1,1  | p <sub>4-8</sub> =0,54<br>p <sub>8-22</sub> =0,013<br>p <sub>4-22</sub> =0,003   |
| 3. Прием ФМ-40, начиная с 6-го мес | 16,4±2,0   | 20,3±2,0  | 12,8±1,7  | p <sub>4-8</sub> =0,18<br>p <sub>8-22</sub> =0,010<br>p <sub>4-22</sub> =0,18    |
| p                                  | p <sub>1-2</sub> =0,10<br>p <sub>1-3</sub> =0,77<br>p <sub>2-3</sub> =0,16 | p <sub>1-2</sub> =0,10<br>p <sub>1-3</sub> =0,01<br>p <sub>2-3</sub> =0,4 | p <sub>1-2</sub> =0,05<br>p <sub>1-3</sub> =0,01<br>p <sub>2-3</sub> =0,3 | —  |

Таблица 3

Уровень IL-6 в сыворотке крови мышей высококорактовой инбредной линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена

| Группы                             | IL-6 (пг/мл)   |  |  | p  |
|------------------------------------|--|--|--|--|
|                                    | 4 мес  | 8 мес  | 22 мес   |  |
| 1. Контроль                        | 80,9±4,1   | 88,5±4,3   | 139,1±6,6  | p <sub>4-8</sub> =0,21<br>p <sub>4-22</sub> =0,001<br>p <sub>8-22</sub> =0,001 |
| 2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес  | 78,7±6,9   | 80,5±7,53  | 114,8±12,3   | p <sub>4-8</sub> =0,85<br>p <sub>4-22</sub> =0,02<br>p <sub>8-22</sub> =0,03   |
| 3. Прием ФМ-40, начиная с 6-го мес | 82,9±6,0   | 84,1±5,9   | 111,4±10,5   | p <sub>4-8</sub> =0,89<br>p <sub>4-22</sub> =0,04<br>p <sub>8-22</sub> =0,03   |
| p                                  | p <sub>1-2</sub> =0,78<br>p <sub>1-3</sub> =0,80<br>p <sub>2-3</sub> =0,64 | p <sub>1-2</sub> =0,40<br>p <sub>1-3</sub> =0,58<br>p <sub>2-3</sub> =0,70 | p <sub>1-2</sub> =0,05<br>p <sub>1-3</sub> =0,03<br>p <sub>2-3</sub> =0,83 | —  |

Таблица 4

Уровень IL-10 в сыворотке крови мышей высококорактовой инбредной линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена

| Возраст                            | IL-10 (пг/мл)  |   |  | p  |
|------------------------------------|--|---|--|--|
|                                    | 4 мес  | 8 мес   | 22 мес   |  |
| 1. Контроль                        | 24,8±2,0   | 31,8±2,7  | 60,9±3,9   | p <sub>4-8</sub> =0,40<br>p <sub>4-22</sub> =0,001<br>p <sub>8-22</sub> =0,001 |
| 2. Прием ФМ-40 в течение 1-го мес  | 20,2±2,7   | 25,1±3,4  | 46,8±5,3   | p <sub>4-8</sub> =0,27<br>p <sub>4-22</sub> =0,004<br>p <sub>8-22</sub> =0,003 |
| 3. Прием ФМ-40, начиная с 6-го мес | 21,5±3,4   | 22,7±2,7  | 45,1±5,6   | p <sub>4-8</sub> =0,77<br>p <sub>4-22</sub> =0,001<br>p <sub>8-22</sub> =0,001 |
| p                                  | p <sub>1-2</sub> =0,26<br>p <sub>1-3</sub> =0,52<br>p <sub>2-3</sub> =0,61 | p <sub>1-2</sub> =0,21<br>p <sub>1-3</sub> =0,047<br>p <sub>2-3</sub> =0,45 | p <sub>1-2</sub> =0,07<br>p <sub>1-3</sub> =0,04<br>p <sub>2-3</sub> =0,82 |  |

Последнее сопровождается снижением содержания IL-6 и IL-10. Применение препарата в лечебном режиме, минуя «критический» период дифференцировки ткани печени, долговременно, кардинально не меняет эффектов, полученных при профилактическом введении МФА. Усиление экспрессии лейкоцитарных интегринов на иммунocyтах может активизировать образование конъюгатов с опухолевыми клетками, что согласуется с подавлением уровней IL-6 и IL-10 [14; 24]. Последнее, вероятно, способствует ослаблению образования противоопухолевых антител, блокирующих антигены опухолевых клеток и, следовательно, рецепторы эффекторов иммунитета [21], а также снижению ингибирования экспрессии в том числе молекул адгезии ICAM-1 на клетках-мишенях [22]. При этом может происходить миграция, накопление иммунных эффекторов и их контактирование с опухолевыми клетками в патологическом узле. В этом случае, во-первых, в клетки опухоли могут проникать факторы разрушения, в том числе протеиназы, лимфотоксины и реактивные интермедиаты кислорода, азота, водорода. Во-вторых, в данных условиях возможна активизация FasAPO1-антигена (рецептора апоптоза), запускающего механизм «самоубийства» клетки [23].

Следует также отметить, что усиление экспрессии лейкоцитарных интегринов на эффекторах иммунитета, снижение уровня интерлейкинов –6 и

–10 в сыворотке крови в данном эксперименте сопровождалось признаками лимфоцитарной инфильтрации и деструкции опухолевых узлов в печени мышей опытных групп, снижением уровня спонтанных гепатокарцином, лучшим соматическим состоянием животных и повышением их выживаемости (неопубликованные данные).

### Заключение

Снижение экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на лимфоцитах параллельно с повышением уровня IL-6 и IL-10 в сыворотке крови у высококорковых самцов мышей линии СВА в онтогенезе может быть связано с развитием спонтанных гепатокарцином, со старением или как с тем, так и с другим процессами.

На основании полученных результатов можно полагать, что коррекция экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на эффекторах иммунитета и сывороточного уровня IL-6 и IL-10 может иметь значение при сдерживании ускользания опухоли от иммунологического надзора для осуществления киллинга опухолевых клеток эффекторами иммунитета, участвующего в противоопухолевых реакциях организма. Вместе с тем нельзя отказываться от предположения, что указанная коррекция играет определенную роль в замедлении процессов старения организма.

### Литература

1. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник московского онкологического общества. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
2. Бочарова О.А. Композиция ингредиентов для Бальзама Алексеевой (Фитомикс-40) // Патент RU № 2099410. 1998.
3. Бочарова О.А., Лысенкова М.А., Куренная О.Н. и др. Способ биологического контроля комплексного фитоадаптогена // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2003. – Т. 136, № 12. – С. 694–6.
4. Бочарова О.А., Барышников А.Ю., Давыдов М.И. Фитоадаптогены в онкологии и геронтологии (на примере изучения Фитомикса-40). – М.: МИА, 2008. – 218 с.
5. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Клименков А.А. и др. Перспективы применения фитоадаптогена в лечении распространенного рака желудка // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2009. – Т. 148, № 7. – С. 96–9.
6. Бочков Н.П., Бочарова О.А., Аксенов А.А. и др. Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы // Медицинская генетика. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 15–9.
7. Гобеев В.Н., Крипах Л.В., Березов Т.Т. Биохимические особенности печени высоко- и низкоракимых линейных мышей, а также первичных спонтанных гепатом // Вопр. мед. хим. – 1978. – Т. 24, № 4. – С. 533–9.
8. Медведев Н.Н. Линейные мыши. – Л.: Медицина, 1964. – 230 с.
9. Фактор В.М., Шипова Л.Я. Уровень клеточной ДНК в спонтанных гепатомах мышей линии СВА. Cell DNA of CBA mouse strain spontaneous hepatomas // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1984. – Т. 97, № 6. – С. 710–3.
10. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Князевкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ // Вопр. биол. мед. фарм. химии. – 2012. – № 10. – С. 52–9.
11. Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Иммунология: атлас. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 624 с.
12. Bilger A., Bennett L., Carabeo R. et al. A potent modifier of liver cancer risk on distal mouse chromosome 1: linkage analysis and characterization of congenic lines // Genetics. – 2004. – 167(2). – P. 859–66.
13. Fillon M. Biomarkers and prostate cancer progression // J Natl Cancer Inst. – 2011. – 103(21). – P. 1570–1.
14. Chiou S., Sheu B., Chang W. et al. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. // Reprod Immunol. – 2005. – 67(1–2). – P. 35–50.
15. Guo L., Song L., Wang Z. Panaxydol inhibits the proliferation and induces the differentiation of human hepatocarcinoma cell line HepG2 // Chem Biol Interact. – 2009. – 181(1). – P. 138–43.
16. Gupta M., Han J., Stenson M. et al. Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma: a mechanism of aberrant JAK2 activation // Blood. – 2012. – 119(12). – P. 2844–53.
17. Hynes R. The extracellular matrix: not just pretty fibrils // Science. – 2009. – 326. – P. 1216–9.
18. Kadioglu A., De Filippo K., Bangert M. The integrins Mac-1 and alpha4beta1 perform crucial roles in neutrophil and T cell recruitment to lungs during Streptococcus pneumoniae infection // J Immunol. – 2011. – 186(10). – P. 5907–15.
19. Kato Y., Hirano T., Yoshida K. et al. Frequent loss of E-cadherin and/or catenins in intrabronchial lesions during carcinogenesis of the bronchial epithelium // Lung Cancer. – 2005. – 48(3). – P. 323–30.
20. Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cell and the adhesion molecules, including carbohydrates // Curr. Drug. Targets. Cardiovasc. Haematol. Disord. – 2005. – 5(1). – P. 39–64.
21. Kim D., Oh S., Kwon H., Lee S. Clinical significance of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in operable gastric cancer // Cancer. – 2009. – 20(9). – P. 155–61.
22. Kim S., Kwon H., Chi D. et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg(3) // Biochem Pharmacol. – 2003. – 65. – P. 75–8.
23. Lascombe I., Clairotte A., Fauconnet S. et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors // Clin Cancer Res. – 2006. – 12(9). – P. 2780–7.
24. Lu P., Zhu X., Xu Z. et al. Increased infiltration of activated tumor-infiltrating lymphocytes after high intensity focused ultrasound ablation of human breast cancer // Surgery. – 2009. – 145(3). – P. 286–93.
25. Neagu S., Lerescu L., Costea R. et al. Perioperative immunologic changes in colorectal cancer patients // Chirurgia (Bucur). – 2012. – 107(1). – P. 59–65.
26. Sasada T., Suekane S. Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance // Immunotherapy. – 2011. – 3(10). – P. 1235–51.
27. Sharp J., Riches A., Littlewood V., Thomas D. The incidence, pathology and transplantation of hepatomas in CBA mice // J Pathol. – 1976. – 119(4). – P. 211–20.

### СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МФА – мультифитоадаптоген



УДК 616-006.6-092.4:577.112.6:615.277.3

А.Н. Балаев<sup>1</sup>, В.Н. Осипов<sup>2</sup>, В.Е. Фёдоров<sup>1</sup>, Л.И. Смирнова<sup>2</sup>, А.П. Смирнова<sup>2</sup>, Л.П. Сушинина<sup>2</sup>,  
С.В. Устинкина<sup>2</sup>, З.С. Смирнова<sup>2</sup>, Л.М. Борисова<sup>2</sup>, М.П. Киселева<sup>2</sup>

### ЭФФЕКТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ АГОНИСТОВ СОМАТОСТАТИНА НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ

<sup>1</sup>ЗАО «Фарм-Синтез», Москва

<sup>2</sup>ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

#### Контактная информация

Осипов Василий Николаевич, старший научный сотрудник лаборатории химического синтеза  
НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(916)412-61-43

e-mail: [ovn@front.ru](mailto:ovn@front.ru)

Статья поступила 27.03.2013, принята к печати 09.07.2013.

#### Резюме

Исследовано влияние синтетических пептидных агонистов соматостатина как в обычной, так и в пролонгированной формах на перевиваемые опухоли мышей: рак шейки матки, эпидермоидную карциному лёгкого Льюис и аденокарциному молочной железы (Ca-755).

**Ключевые слова:** агонисты соматостатина, противоопухолевая активность, синтетические пептиды.

A.N. Balaev<sup>1</sup>, V.N. Osipov<sup>2</sup>, V.E. Fedorov<sup>1</sup>, L.I. Smirnova<sup>2</sup>, A.P. Smirnova<sup>2</sup>, L.P. Sushinina<sup>2</sup>,  
S.V. Ustinkina<sup>2</sup>, Z.S. Smirnova<sup>2</sup>, L.M. Borisova<sup>2</sup>, M.P. Kiseleva<sup>2</sup>

### SYNTHETIC PEPTIDE SOMATOSTATINE AGONIST EFFECT ON GROWTH OF TRANSPLANTED TUMORS OF MICES

<sup>1</sup>CJSC «PHARM-SINTEZ», MOSCOW

<sup>2</sup>FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

#### Abstract

Investigated the antitumor activity of synthetic peptide somatostatin agonists on models of transplanted tumors in mice: cervical cancer, Lewis lung epidermoid carcinoma and mammary adenocarcinoma (Ca-755) as in the ordinary and in the long-acting forms.

**Key words:** somatostatine agonists, antitumor activity, synthetic peptides.

#### Введение

Нейроэндокринные опухоли органов брюшной полости и забрюшинной клетчатки, включая и карциноидные опухоли, являются сравнительно распространёнными. Их частота составляет 25–50 новых наблюдений на 1 млн. населения в год. Ежегодная смертность при этих заболеваниях составляет до 30 % от числа выявленных больных [2; 6; 7].

Вследствие своего взаимодействия с соматостатиновыми рецепторами опухоли агонисты соматостатина (как, например, Октреотид) подавляют секрецию гормонов и оказывают антипролиферативное действие. На основании такого механизма действия эти вещества не только уменьшают симптомы, связанные с гормональной активностью опухоли, но и замедляют или останавливают ее рост [3; 8; 9].

Проведённые ранее исследования цитотоксической активности [1] пептидных агонистов соматостатина, содержащих фрагмент -Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-, на клеточных линиях опухолей человека, экспрессирующих рецепторы соматостатина: карциномы простаты человека LNCap, LNCap-LN3, LNCap-clon FGC и нейробластома человека SH-SY5Y, показали достоверно значимое антипролиферативное действие.

Поэтому было решено проверить их противоопухолевую активность на перевиваемых опухолях мышей в двух лекарственных формах: в виде раствора и пролонгированной (депо) форме.

#### Материалы и методы

ПГ-46 (H-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-OMe) синтезирован известным ранее методом [5], синтез ПГ-114 (H-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-OMe диацетат) осуществлён по [1], Октреотид, чистотой 99,5%+, синтезирован на ЗАО «Фарм-Синтез» (г. Москва).

Все пептиды применялись в двух лекарственных формах: депо (в растворе маннита) и в виде раствора (в физ. р-ре) на перевиваемых опухолях мышей: РШМ-5, LLC и аденокарциноме молочной железы Ca-755. Лечение проводили через 48 ч после перевивки опухоли. Путь и режимы введения, дозы указаны в таблицах.

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили: ТРО, % и увеличение продолжительности жизни (Т/С, %). Минимальные критерии активности – торможение роста опухоли  $\geq 50$  %, увеличение продолжительности жизни  $\geq 25$  %.

Переносимость препаратов оценивали по ранней гибели мышей по сравнению с контрольными животными и состоянию внутренних органов животных (масса селезенки), изменению массы тела по сравнению с исходной.

Статистическая значимость противоопухолевого эффекта по отношению к нелеченному контролю определялась по методу Фишера-Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

Группы формировались с учетом получения статистически достоверных результатов: контроль-

ная группа состояла не менее чем из 10 мышей, опытная группа – из 8–10 животных. Опыты на каждой модели повторяли дважды.

Депо формы пептидов (микросферы 10–90 микрон) были изготовлены методом двойной эмульсии. К раствору пептида в воде добавляют раствор полимера RG503H (poly-d,l-lactide-co-glycolide) в хлористом метиле. Смесь гомогенизируют и выливают в раствор стабилизатора эмульсии (раствор натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и манита в воде). Перемешивают до получения устойчивой эмульсии и выливают её в водный раствор твина-80. Продолжают перемешивание до полного испарения хлористого метилена. Центрифугируют образующиеся микросферы, просеивают через сита 90 микрон, промывают водой для отмыывания стабилизатора эмульсии, снова центрифугируют и лиофилизируют. Получают микросферы с содержанием 30 мг пептида в 1 г микросфер.

### Результаты и обсуждение

Данные представленные в табл. 1 показывают, что на РШМ-5 противоопухолевая эффективность аналогов соматостатина ПГ-46 и Октреотида в депо-форме в дозе 4 мг/кг (доза соответствует 20 мг при пересчете дозы для человека) при внутримышечном введении ниже минимального критерия противоопухолевой активности по ТРО [4]. В то же время ПГ-114 в депо-форме в дозе 4 мг/кг вызывал кратковременный статистически значимый противоопухолевый эффект – торможение роста РШМ-5 на 3 день после введения препарата составляло 69 %, а к 10 дню снижалось уже до 48 %.

На РШМ-5 при увеличении вводимой внутримышечно однократно дозы депо-формы до 50 мг/кг противоопухолевая активность выявлена у ПГ-46 и составляет 60 % ТРО на 3 день после введения препарата (табл. 2). Терапевтический эффект снижался к 9 дню после проведения лечения до 43 % ТРО. ПГ-114 в депо-форме на 3 день после введения препарата тормозил рост РШМ-5 на 52 % ( $p>0,05$ ), но к 9 дню противоопухолевый эффект повысился до 65 % ТРО и становится статистически значимым ( $p=0,05$ ). Однако к 16 дню противоопухолевая активность ПГ-114 снижается до 31 % ТРО. Тогда как у Октреотида в депо-форме при повышении вводимой дозы до 50 мг/кг терапевтический эффект оставался ниже минимального критерия противоопухолевой активности по ТРО. ПГ-114 в физиологическом растворе в дозе 10 мг/кг при введении внутримышечно 5 раз с интервалом в 7 дней, на 3 день после первого введения препарата, оказывал терапевтический эффект практически равный минимальному критерию противоопухолевой активности (ТРО=49 %). Растворитель манит не проявлял противоопухолевого действия, а следовательно не влиял на эффективность аналогов гипоталамического гормона соматостатина.

При изучении противоопухолевой активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина в разных лекарственных дозах и при разных путях введения на LLC было показано, что только ПГ-114 растворимый в воде при подкожном и внутримышечном введении проявлял статистически значимый противоопухолевый эффект (табл. 3). Так, непосредственно после окончания ежедневного подкожного введения препарата в течение 5 дней, на 7 день после перевивки опухоли ТРО составляло 79 %, к 13 дню опыта ТРО снижалось до 50 %, а к 17 дню до 39 %. Однако следует отметить, что даже ТРО=39 % статистически

значимое. ПГ-114 растворимый в воде при внутримышечном введении проявлял более слабый, но статистически значимый противоопухолевый эффект только на 7 день после перевивки опухоли – ТРО составляло 56 %. ПГ-114 в депо-форме на LLC не проявлял противоопухолевой активности как при разных режимах, так и путях введения. Отсутствие эффективности Октреотида в депо-форме свидетельствует о низкой экспрессии или отсутствии Рц (1,3,5) соматостатина, с которыми препарат должен был связаться в клетках перевиваемых опухолях РШМ-5 и LLC.

Изучение противоопухолевой активности на Са-755 аналогов гипоталамического гормона соматостатина в растворимой в воде форме при ежедневном подкожном введении в течение 5 дней в дозе 10 мг/кг показало, что ПГ-46 проявляет слабое противоопухолевое действие равное 52 % ТРО. В то же время Октреотид в той же лекарственной форме и при том же пути введения оказывал длительное в течение 10 дней статистически значимое противоопухолевое действие. ПГ-114 в растворимой форме на Са-755 не проявлял противоопухолевого действия.

### Выводы

1. В результате проведенных исследований установлено, что спектр противоопухолевого действия на изученных перевиваемых моделях опухолевого роста мышей 3 пептидных агонистов гормона соматостатина различается. Так, ПГ-46 в депо-форме в дозе 50 мг/кг проявляет кратковременный статистически значимый противоопухолевый эффект равный 60 % ТРО на РШМ-5 на 3 день после введения препарата. Кроме того, в растворимой в воде лекарственной форме при ежедневном подкожном введении в течение 5 дней в дозе 10 мг/кг ПГ-46 проявляет слабое противоопухолевое действие равное 52 % ТРО на Са-755.
2. Установлено, что ПГ-114 в депо-форме оказывает кратковременный противоопухолевый эффект на РШМ-5 в дозе 4 мг/кг на 3 день после введения препарата (69 % ТРО), а в дозе 50 мг/кг более длительный на 3 и 9 дни после лечения (52 % и 65 % ТРО). Максимальный статистически значимый терапевтический эффект наблюдается на 9 день после введения препарата и составляет 65 % ТРО.
3. Показано, что на LLC в растворимой в воде форме ПГ-114 при подкожном введении в течение 5 дней вызывает статистически значимый противоопухолевый эффект в течение 10 дней: 79 % – 50 % – 39 %, однако при этом не вызывает увеличения продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными животными.
4. Установлено, что Октреотид проявляет статистически значимый противоопухолевый эффект в течение 10 дней только на Са-755 в растворимой лекарственной форме при ежедневном подкожном введении в течение 5 дней в дозе 10 мг/кг, ТРО составляет 48–67 %. Максимальное противоопухолевое действие препарат оказывает на 10 день после перевивки опухоли (на 4 день после окончания введения препарата) равное 67 % ТРО.

Таблица 1

Терапевтическая эффективность аналогов гипоталамического гормона соматостатина в депо-форме в дозе 4 мг/кг на РШМ-5

| Препарат  | ТРО, % (дни после введения препаратов) |    |    | СПЖ, дни   | Т/С, % |
|-----------|--|----|----|------------|--------|
|           | 3                                      | 10 | 17 |            |        |
| Контроль  | –                                      | –  | –  | 26,3 ± 3,6 | –      |
| ПГ-46     | 46                                     | 16 | 9  | 25,8 ± 2,6 | 98     |
| ПГ-114    | 69*                                    | 48 | 25 | 25,8 ± 2,4 | 98     |
| Октреотид | 36                                     | 25 | 9  | 24,5 ± 3,1 | 93     |
| Маннит    | 1                                      | 18 | 10 | 25,3 ± 2,8 | 98     |

\*p = 0,05 по отношению к контролю

Таблица 2

Терапевтическая эффективность аналогов гипоталамического гормона соматостатина в разных лекарственных формах на РШМ-5

| Препарат              | Доза (мг/кг) ×<br>n введений | ТРО, % (дни после введения препаратов) |     |    | СПЖ, дни   | Т/С, % |
|-----------------------|------------------------------|--|-----|----|------------|--------|
|                       |                              | 3                                      | 9   | 16 |            |        |
| Контроль              | –                            | –                                      | –   | –  | 22,6 ± 3,7 | –      |
| ПГ-46 депо-форма      | 50 × 1                       | 60*                                    | 43  | 0  | 22,1 ± 3,6 | 100    |
| ПГ-114 депо-форма     | 50 × 1                       | 52                                     | 65* | 31 | 22,5 ± 2,6 | 100    |
| ПГ-114 в физ.растворе | 10/24 × 5                    | 49                                     | 47  | 16 | 23,1 ± 3,2 | 95     |
| Октреотид депо-форма  | 50 × 1                       | 45                                     | 20  | +6 | 21,9 ± 2,3 | 100    |
| Маннит                | 0,1 мл × 1                   | 5                                      | 12  | +2 | 21,8 ± 2,1 | 100    |

\*p < 0,05 по отношению к контролю

Таблица 3

Терапевтическая эффективность аналогов гипоталамического гормона соматостатина в разных лекарственных дозах и при разных путях введения на LLC

| Препарат             | Режим введения | Путь введения | ТРО, % (дни после перевивки опухоли) |     |     |    | СПЖ, дни   | Т/С, % |
|----------------------|----------------|---------------|--------------------------------------|-----|-----|----|------------|--------|
|                      |                |               | 7                                    | 13  | 17  | 22 |            |        |
| Контроль             | –              | –             | –                                    | –   | –   | –  | 40,0 ± 2,6 | –      |
| ПГ-114 депо-форма    | 50 × 1         | в/м           | 5                                    | 11  | 9   | 3  | 38,3 ± 5,4 | 96     |
|                      | 50 × 1         | п/к           | 15                                   | 3   | 10  | 6  | 39,0 ± 2,7 | 97     |
|                      | 25 × 2**       | в/м           | +13                                  | 13  | 16  | 6  | 35,8 ± 2,7 | 89     |
| ПГ-114 растворимый   | 10/24 × 5      | в/м           | 56*                                  | 11  | 17  | 5  | 38,8 ± 4,7 | 97     |
|                      | 10/24 × 5      | п/к           | 79*                                  | 50* | 39* | 24 | 40,3 ± 2,9 | 101    |
| Октреотид депо-форма | 50 × 1         | в/м           | +15                                  | 4   | 6   | +4 | 37,6 ± 5,9 | 96     |
|                      | 50 × 1         | п/к           | 5                                    | 36  | 16  | +4 | 40,6 ± 4,2 | 102    |
|                      | 25 × 2**       | в/м           | +36                                  | 24  | 14  | +7 | 39,0 ± 4,0 | 97     |

\*p < 0,05 по отношению к контролю;

\*\*двукратное введение с интервалом 7 дней.

Таблица 4

Терапевтическая эффективность аналогов гипоталамического гормона соматостатина в растворимой форме при ежедневном подкожном введении в течение 5 дней в дозе 10 мг/кг на Ca-755

| Препарат        | ТРО, % (дни после перевивки опухоли) |     |     |     |    | СПЖ (дни)  | Т/С, % |
|-----------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|----|------------|--------|
|                 | 7                                    | 10  | 13  | 17  | 20 |            |        |
| Контроль        | –                                    | –   | –   | –   | –  | 20,6 ± 4,6 | –      |
| ПГ-46 (мономер) | 26                                   | 52* | 31  | 28  | 14 | 22,4 ± 5,9 | 109    |
| ПГ-46 (димер)   | 0                                    | 11  | 33  | 40  | 49 | 20,4 ± 2,4 | 100    |
| ПГ-114          | 19                                   | 37  | 37  | 44  | 20 | 17,5 ± 2,6 | 95     |
| Октреотид       | 48*                                  | 67* | 58* | *63 | 47 | 23,6 ± 7,4 | 114    |

\*p < 0,05 по отношению к контролю

### Литература

1. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Фёдоров В.Е. и др. Синтез и изучение цитотоксической активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 47–53.
2. Горбунова В.А., Орел Н.Ф., Кузминов А.Е. Современные направления лечения нейроэндокринных опухолей // Современная онкология. – 2010. – №1. – С. 7–12.
3. Егоров А.В., Кондрашин С.А., Фоминых Е.В. и др. Аналоги соматостатина в диагностике и лечении нейроэндокринных опухолей // Анналы хирургической гепатологии. – 2009. – Т. 14, № 4. – С. 1–7.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. (Под редакцией А.Н.Миронова, ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России.) – М.: Гриф и К, 2012 – 944 с.

5. Смирнова Л.И., Устинкина С.В., Смирнова А.П. и др. Средство, обладающее противоопухолевым действием. Патент № 2254139.
6. Massironi S., Sciola V., Peracchi M. et al. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero- pancreatic system // World J. Gastroenterol. – 2008. – 14(35). – P. 5377–84.
7. Modlin I.M., Öberg K., Chung D.C. et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors // Lancet Oncol. – 2008. – 9. – P. 61–72.
8. Susini C., Buscail L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents // Ann Oncol. – 2006. – 17(12). – P. 1733–42.
9. Pollak M.N., Schally A.V. Mechanism of antineoplastic action of somatostatin analogs // Proc Soc Exp Biol Med. – 1998. – 217(2). – P. 143–52.

## СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

|       |                            |
|-------|----------------------------|
| РШМ-5 | – рак шейки матки          |
| LLC   | – карцинома лёгкого Льюис  |
| ТРО   | – торможение роста опухоли |

О.А. Бочарова, В.А. Ильенко, Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, А.Ю. Барышников

### ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ МЫШЕЙ ВЫСОКОРАКОВОЙ ЛИНИИ СВА УВЕЛИЧИВАЕТСЯ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФИТОАДАПТОГЕНА В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ

ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

**Задача исследования.** Оценить влияние комплексного фитоадаптогена при профилактическом применении на продолжительности жизни мышей линии СВА, наследственно предрасположенных к развитию гепатокарцином. **Материалы и методы.** Фитомикс-40 – стандартизованный препарат, включающий компоненты 40 растительных экстрактов; обладает иммуномодулирующим, адгезиогенным, интерферогенным, антимутагенным, антиоксидантным, радиопротекторным эффектами. В работе использовали 140 мышей линии СВА: 1 группа (n=70) – контрольная, мыши получали в качестве питья воду; 2 группа (n=70) – опытная, мыши получали фитомикс-40 с питьевой водой в профилактическом режиме в течение 1-го месяца постнатального развития, включая критический период дифференцировки ткани печени. Среднюю продолжительность жизни (СПЖ) и медиану выживаемости определяли по методу Каплан-Мейера.

**Результаты.** СПЖ мышей контрольной группы в среднем не достигала 22 месяцев. Медиана выживаемости мышей контрольной группы составила 21,1 месяц. Профилактическое применение фитомикса-40 способствовало удлинению жизни опытных мышей на 14,5 % (p<0,001). Медиана выживаемости при этом повысилась на 23 % и составила 25,9 месяцев. Ни одно животное контрольной группы не пережило 1000 дней. В опытной группе указанный срок (около 33 месяцев) пережило 2 мыши (p<0,001). Повышение выживаемости мышей опытных групп сопровождалось увеличением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, снижением сывороточного уровня интерлейкинов-6 и -10, уменьшением частоты возникновения гепатом, лучшим соматическим состоянием животных.

**Выводы.** Профилактическое введение комплексного фитоадаптогена с адгезиогенным действием при спонтанном канцерогенезе увеличивает выживаемость экспериментальных животных; полученные результаты могут быть перспективны для разработки способа профилактики опухолей, возникающих при соответствующей генетической предрасположенности.

Р.В. Карпова, О.А. Бочарова, В.А. Ильенко, Е.В. Бочаров, А.Ю. Барышников

### ЛИМФОЦИТАРНАЯ ИНФИЛЬТРАЦИЯ ОПУХОЛЕЙ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ВЫСОКОРАКОВОЙ ЛИНИИ СВА

#### ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИТОАДАПТОГЕНА

ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

**Задача исследования.** Оценить морфологические изменения в ткани печени мышей линии СВА, наследственно предрасположенных к спонтанному гепатоканцерогенезу, при профилактическом применении комплексного фитоадаптогена фитомикса-40.

**Материалы и методы.** Фитомикс-40 – стандартизованный препарат, включающий компоненты 40 растительных экстрактов; обладает иммуномодулирующим, адгезиогенным, интерферогенным, антимутагенным, антиоксидантным, радиопротекторным эффектами. В работе использовали 140 мышей-самцов линии СВА: 1 группа (n=70) – контрольная, мыши получали в качестве питья воду; 2 группа (n=70) – опытная, мыши получали фитомикс-40 с питьевой водой в профилактическом режиме в течение 1-го месяца постнатального развития, включая критический период дифференцировки ткани печени. Гистологическое исследование печени контрольных и опытных животных проводили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином.

**Результаты.** В возрасте 4 месяцев у мышей контрольной и опытной группы опухоли обнаружены не были. В возрасте 8 месяцев у 10 % контрольных животных выявлены трабекулярные гепатокарциномы умеренной дифференцировки. В возрасте 22 месяцев у всех мышей контрольной группы и у 69,2 % мышей опытной группы микроскопически обнаружены умеренно- и низкодифференцированные трабекулярные и трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы, т.е. опухоли смешанного строения. Вместе с тем в спонтанных гепатокарциномах мышей опытной группы выявлена выраженная лимфоцитарная инфильтрация опухолей и признаки деструкции. В печени мышей контрольной группы инфильтрации опухоли лимфоцитами не наблюдали. Лимфоцитарная инфильтрация и деструкция опухолей опытных животных сопровождалась повышением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на эффекторах иммунитета. При этом у опытных животных наблюдали снижение частоты и размера опухолей, а также повышение продолжительности жизни.

**Выводы.** Выявление лимфоцитарной инфильтрации и деструкции опухолевых участков в печени животных при профилактическом применении фитоадаптогена является благоприятным прогностическим фактором течения опухолевого процесса.

УДК 618.146-006.6:612.017.1:615.37

Д.К. Кенбаева

**КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ:  
СРАВНЕНИЕ ВАРИАНТОВ ИММУНОТЕРАПИИ***Городской онкологический диспансер, Астана, Республика Казахстан***Контактная информация:***Кенбаева Динара Кумаровна, канд. мед. наук, заведующая отделением гинекологии Городского онкологического диспансера***адрес:** Республика Казахстан, г. Астана, пр-т Шакарима Кудайбердиева, д.24/1, кв. 116; тел. 8(701)543-0599**e-mail:** [dikenb@mail.ru](mailto:dikenb@mail.ru)

Статья поступила 31.08.2012, принята в печать 09.07.2013.

**Резюме**

**Цель исследования** – дать сравнительную характеристику показателей клеточного звена иммунной системы при специфической и комбинированной иммунотерапии больных раком шейки матки.

Обследованы 76 больных РШМ, подвергавшихся сочетанной лучевой терапии и иммунотерапии. В группе сравнения (40 пациенток) осуществлена активация лимфоцитов *in vitro* путем инкубации с опухолевым антигеном и интерлейкином-2.

В основной группе (36 больных) данный метод иммунотерапии дополнен системным применением ронколейкина и ФлогэнзимТМа. Определялись показатели клеточного иммунитета, включая содержание Т-киллеров и натуральных киллеров в периферической крови.

Полученные данные свидетельствуют о значимом по ряду показателей превышении результатов коррекции нарушений со стороны клеточного звена иммунной системы в основной группе, при сочетанной иммунотерапии. Особенно обращает на себя внимание превышение содержания клеток с киллерной активностью, обеспечивающих эффективный противоопухолевый иммунный ответ.

**Ключевые слова:** рак шейки матки; иммунотерапия; клеточный противоопухолевый иммунитет.

D.K. Kenbaeva

**CELLULAR IMMUNITY AT A CERVICAL CANCER:  
COMPARISON OF IMMUNOTHERAPY VERSIONS***Oncologic dispensary, Astana, Kazakhstan***Abstract**

Research objective is to give the comparative characteristic of indicators of a cellular link of immune system at the specific and combined immunotherapy of patients with cervical cancer.

Are surveyed 76 patients with cervical cancer which were exposed to combined radiation therapy and an immunotherapy. Activation of lymphocytes of *in vitro* by an incubation way with a tumoral anti-gene and interleykinom-2 is carried out in the group of comparison (40 patients).

In the main group (36 patients) this method of an immunotherapy is added with system application of Ronco-leukin and Flogenzim. Indicators of cellular immunity were defined, including the maintenance of T-killers and natural killers in peripheral blood.

The obtained data testify about significant on a number of indicators excess of results of correction of violations from a cellular link of immune system in the main group, at a combined immunotherapy. Especially attracts attention excess of the maintenance of cages with the killer's activity, providing the effective antineoplastic immune reaction.

**Keywords:** cervical cancer; immune therapy; cell antitumor immunity.**Введение**

Иммунотерапия в течение последних тридцати лет стала неотъемлемым компонентом лечения ряда злокачественных новообразований. В то же время, весь комплекс разработанных способов и подходов до настоящего времени не обеспечивает достаточного лечебного эффекта в отношении большого числа форм новообразований [2; 8]. Лишь в минимальной степени проведены экспериментальные и клинические работы по иммунотерапии РШМ [7], а в нашей стране это направление не развивалось вовсе.

«Субъектом» иммунотерапии, проводимой в любых формах и вариантах, остаются иммунокомпетентные клетки, обладающие киллерной и хелперной активностью [1; 3]. Методы воздействия на них предусматривают активацию с помощью вак-

цин, факторов межклеточного взаимодействия, других ауто- и аллогенных стимуляторов пролиферации, дифференцировки, физических факторов и т.д. [4; 6]. Вероятно, наиболее эффективным подходом в этом плане могло бы являться использование комплекса иммуностимулирующих факторов, включающего опухолевый антиген в той или иной форме, интерлейкины, стимулирующие дифференцировку [4; 5]. Причем применение последнего подхода оправдано как при использовании версии ЛАК-терапии со стимуляцией *in vitro*, так и системным введением цитокинов.

Дополнительная активация неспецифических механизмов иммунитета, повышение доступности опухолевых антигенов за счет увеличения протеолитической активности сыворотки крови также считается перспективным и адекватным направлением в комплексной иммунотерапии.

**Цель исследования** – дать сравнительную характеристику показателей клеточного звена иммунной системы при специфической и сочетанной иммунотерапии больных раком шейки матки.

### Материалы и методы

В клинических условиях (Региональный онкологический диспансер, г. Семей, Городской онкологический диспансер, г. Астана, Республика Казахстан) обследованы 76 больных РШМ, подвергавшихся консервативному (базисному) лечению (сочетанной лучевой терапии – СЛТ). На фоне лучевого лечения осуществлена иммунотерапия в двух вариантах. Первый (группа сравнения) предусматривал реинфузию аутолимфоцитов, подвергавшихся *in vitro* инкубации с опухолевым антигеном (гомогенат аутологичной опухолевой ткани) и интерлейкином-2. При втором варианте (основная группа) вышеуказанный метод иммунотерапии был дополнен системным применением препарата интерлейкина-2 (Ронколейкин) и средства из группы системных энзимов (Флогэнзим<sup>TM</sup>).

Специфическую иммунотерапию осуществлялась следующим образом. У пациента проводили забор 50 мл нативной венозной крови. Для предотвращения свертывания непосредственно после взятия добавляли гепарин. Выделение лейкоцитов осуществляли из крови путем центрифугирования на градиенте фикол-верографин (плотность 1,076) раздельно в 5 пробирках по 10 мл. Полученные на градиенте лейкоциты снимали пипеткой и переносили в общую пробирку с питательной средой (раствор Хенкса или среда 199), далее повторно выделяли на аналогичном градиенте плотности в одной пробирке. Снятые с градиента плотности лейкоциты ресуспендировали в питательной среде объемом 10 мл. В среду добавляли 10000 МЕ IL-2 (ронколейкин 0,01 мг) и инкубировали в термостате при 37 °C в течение 6 ч.

Биопсийный материал злокачественного новообразования в объеме 2–3 мл разводили в 10 мл дистиллированной воды и гомогенизировали 500 Вт ультразвуковым гомогенизатором (Cole Parmer, США) в течение 15 минут, что гарантировало полное разрушение клеточных элементов при сохранении основных белковых антигенных детерминантов. Для исключения попадания неразрушенных клеток в среду инкубации и далее в организм материал подвергали фильтрации (фильтры NucleoSpin, Macherey-Nagel, Германия) с последующим осаждением на ультрацентрифуге (10000 g в течение 10 мин.).

Полученный гомогенат добавляли к инкубированным лейкоцитам в количестве 1 мл на 5 мл питательной среды с лейкоцитами и инкубировали далее 12 ч при 37 °C. Взвесь лейкоцитов после инкубации разделяли на порции по 5 мл и выделяли на градиенте фикол-верографин, трижды ресуспендировали в аналогичной питательной среде, окончательно выделяли и вводили в организм реципиента путем внутривенной инъекции.

В качестве АИТ применялся Флогэнзим<sup>TM</sup> (по схеме: 5 таблеток 3 раза в день в течение 3 суток, 4 таблетки 3 раза в день в течение 7 суток (доза насыщения) и далее по 3 таблетки 3 раза в день до 1 месяца) и ронколейкин (в дозе 200000–250000 МЕ/кг в течение 4 недель через 2 суток внутривенно капельно в 400 мл физиологического раствора (продолжительность инфузии 4 ч) при пребывании пациентов в условиях стационара или в той же дозе подкожно в 2 мл физиологического раствора при

лечении в амбулаторных условиях). Применение методики иммунотерапии было одобрено решением этической комиссии научно-клинического отдела Государственного медицинского университета г. Семей (№76 от 20.05.2009 г.) и этического комитета АО «Медицинский университет «Астана»» (№12 от 17.03.2010 г.).

В группу сравнения были включены 40 пациенток (по 20 с IВ стадией – T<sub>26</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> и III стадией – T<sub>1-2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>0-1</sub>M<sub>0</sub>), получавшие сочетанную лучевую терапию (СЛТ) и специфическую иммунотерапию (СИТ). В основную группу соответственно включены 19 и 17 больных, получавшие СЛТ, СИТ и АИТ.

Критерии включения больных в исследование:

- наличие РШМ IВ и III ст. при первичном обследовании;
- возраст от 30 до 70 лет;
- осуществление хирургического лечения и/или сочетанной лучевой терапии в качестве основного лечения;
- наличие информированного согласия пациенток на проведение комбинированного лечения, включающего специфическую иммунотерапию и иммуномодулирующую терапию, а также на анонимное использование полученных данных в рамках научного исследования.

Критерии исключения:

- отсутствие информированного согласия пациентки или отказ от участия в исследовании на любом этапе кроме последнего (обобщение обработанной информации);
- наличие тяжелых сопутствующих соматических и системных заболеваний;
- летальный исход до завершения курса лечения.

Определяли число общих Т-лимфоцитов и в зависимости от кластеров дифференцировки: CD3<sup>+</sup> зрелые Т-лимфоциты (Beckman Coulter, №A07746); CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-хелперы (Beckman Coulter, №A07750); CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> натуральные киллеры (Beckman Coulter, №A07735); CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Т-киллеры (Beckman Coulter, №A07415) методом ИФА на проточном цитометре Beckman Coulter.

При анализе клинических данных использованы параметрические и непараметрические методы. Сравнение количественных признаков проводилось с помощью критерия Стьюдента. Ограничения использования данного метода включали анализ распределения по критерию Колмогорова-Смирнова, а также несоблюдение равенства дисперсий числовых рядов.

При несоблюдении критериев применимости параметрических методов использован непараметрический метод анализа в независимых выборках по критерию Манна-Уитни. Граничным уровнем статистической значимости различий принимался p<0,05.

### Результаты и обсуждение

Основные результаты иммунотерапии в настоящем исследовании представлены в табл. 1–2.

В основной группе и группе сравнения не было существенных различий показателей содержания общих лимфоцитов. Аналогично, не было существенных различий с контрольной группой по абсолютному содержанию в крови CD3<sup>+</sup> клеток, причём данный показатель был выше в основной группе, чем в группе сравнения на 20,2 % (p<0,05).

Таблица 1

Особенности показателей клеточного звена иммунитета у больных РШМ IIВ ст. при проведении иммунотерапии

| Показатели                             | Контрольная группа, n=45 | Больные РШМ IIВ ст.    |                       |
|--|--------------------------|------------------------|-----------------------|
|  |                          | группа сравнения, n=20 | основная группа, n=19 |
| Лимфоциты общ., $\times 10^9/\text{л}$ | 2,10±0,09                | 1,93±0,09              | 2,12±0,09             |
| CD3+, $\times 10^9/\text{л}$           | 1,45±0,06                | 1,14±0,05*             | 1,37±0,06**           |
| CD3+,%                                 | 69,0±2,4                 | 59,1±2,3*              | 64,6±2,5              |
| CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$       | 0,89±0,05                | 0,81±0,05              | 0,94±0,05             |
| CD3+CD4+,%                             | 42,4±1,9                 | 42,0±2,1               | 44,3±2,1              |
| CD3-CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$ | 0,17±0,01                | 0,15±0,01              | 0,20±0,01* **         |
| CD3-CD56+CD16+,%                       | 8,1±0,5                  | 7,8±0,5                | 9,4±0,5               |
| CD3+CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$ | 0,11±0,01                | 0,07±0,01*             | 0,10±0,01**           |
| CD3+CD56+CD16+,%                       | 5,3±0,4                  | 3,7±0,3*               | 4,7±0,3**             |

\*различия с показателем контрольной группы статистически значимы,  $p < 0,05$ ;  
\*\*различия с показателем группы сравнения статистически значимы,  $p < 0,05$ .

Таблица 2

Особенности показателей клеточного звена иммунитета у больных РШМ III ст. при проведении иммунотерапии

| Показатели                             | Контрольная группа, n=45 | Больные РШМ III ст.    |                       |
|--|--------------------------|------------------------|-----------------------|
|  |                          | группа сравнения, n=20 | основная группа, n=17 |
| Лимфоциты общ., $\times 10^9/\text{л}$ | 2,10±0,09                | 1,57±0,09*             | 1,95±0,09***          |
| CD3+, $\times 10^9/\text{л}$           | 1,45±0,06                | 1,08±0,06*             | 1,41±0,06***          |
| CD3+,%                                 | 69,0±2,4                 | 68,8±3,1               | 72,3±2,9              |
| CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$       | 0,89±0,05                | 0,73±0,05*             | 0,88±0,05***          |
| CD3+CD4+,%                             | 42,4±1,9                 | 46,5±2,7               | 45,1±2,4              |
| CD3-CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$ | 0,17±0,01                | 0,10±0,01**            | 0,15±0,01***          |
| CD3-CD56+CD16+,%                       | 8,1±0,5                  | 6,4±0,5*               | 7,7±0,4               |
| CD3+CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$ | 0,11±0,01                | 0,06±0,01*             | 0,10±0,01***          |
| CD3+CD56+CD16+,%                       | 5,3±0,4                  | 3,9±0,2*               | 5,1±0,3***            |

\*различия с показателем контрольной группы статистически значимы,  $p < 0,05$ ;  
\*\* различия с показателем контрольной группы статистически значимы,  $p < 0,01$ ;  
\*\*\*различия с показателем группы сравнения статистически значимы,  $p < 0,05$ .

Таблица 3

Анализ 3-летней выживаемости больных обследованных групп в зависимости от проведенного лечения

| РШМ IIВ ст. | СЛТ + СИТ, n=20       |                       | 17 | 85,0 % |
|-------------|-----------------------|-----------------------|----|--------|
|             |                       | СЛТ + СИТ + АИТ, n=19 |    | 18     |
| РШМ III ст. | СЛТ + СИТ, n=20       |                       | 15 | 75,0 % |
|             | СЛТ + СИТ + АИТ, n=17 |                       | 15 | 88,2 % |

По относительному содержанию CD3<sup>+</sup> клеток значимых различий между группами не было. Абсолютное число и относительное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток в группе СИТ+АИТ незначимо превысило как показатели группы СИТ, так и контрольные значения.

Было выявлено значимое превышение содержания натуральных киллеров над значениями полученными в группе СЛТ+СИТ – на 33,3 % и 20,9 % соответственно ( $p < 0,05$  в обоих случаях).

Полностью нормализовалось также абсолютное и практически полностью – относительное содержание Т-киллеров за счёт превышения над показателями группы СИТ на 42,9 и 27,5 % соответственно ( $p < 0,05$  также в обоих случаях).

Содержание общих лимфоцитов в крови больных основной группы не имело значимых различий с контролем и на 24,2 % превышало показатель группы сравнения ( $p < 0,05$ ).

Имелось также значимое превышение числа CD3<sup>+</sup> над показателем группы сравнения (на 30,6 %,  $p < 0,05$ ). По относительной величине их содержания различий между группами не было.

В результате проведения сочетанной иммунотерапии наблюдалась полная нормализация содержания в крови Т-лимфоцитов-хелперов.

Превышение над группой сравнения по абсолютному показателю было статистически значимым и составило 20,9 % ( $p < 0,05$ ).

Более выраженное, чем в крови больных группы РШМ IIВ ст., снижение абсолютного и относительного числа натуральных киллеров дало более значительное различие по данному показателю между группами обследованных женщин.

Так, степень превышения по абсолютной величине составила 49,7 % ( $p < 0,05$ ), значимых различий с контролем не наблюдалось. По относительному содержанию CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток превышение над группой сравнения составило 20,2 % ( $p > 0,05$ ).

Как по абсолютному, так и по относительному содержанию CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток в основной группе не было различий с контролем и наблюдалось значимое превышение над группой сравнения (на 66,7 и 31,5 %,  $p < 0,05$  в обоих случаях).

В табл. 3 представлены данные о 3-летней выживаемости обследованных больных в целом по всем группам в зависимости от стадии и проведенного лечения. Анализ показал наличие её зависимости от проводимой терапии.

Имело место превышение 3-летней выживаемости по отношению к группе сравнения при IIВ стадии на 9,7 %, при III стадии – на 13,2 %.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значимом по ряду показателей превышении результатов коррекции нарушений со стороны клеточного звена иммунной системы в основной группе, при сочетанной иммунотерапии.

Особенно обращает на себя внимание повышение содержания клеток с киллерной активностью, обеспечивающих эффективный противоопухолевый иммунный ответ. В целом проведенный анализ наиболее четко свидетельствует о клинической эффективности применения методов специ-

фической и адоптивной иммунотерапии у больных раком шейки матки, что выразилось в увеличении степени лучевого патоморфоза, уменьшении постлучевых реакций и осложнений, улучшении качества жизни, повышении 3- и 5-летней выживаемости.

### Литература

1. *Hamdy S., Haddadi A., Ghotbi Z. et al.* Part I: targeted particles for cancer immunotherapy // *Curr Drug Deliv.* – 2011. – 8(3). – P. 261–73.
2. *Harada Y., Yonemitsu Y.* New technologies for immunotherapy against cancer: development of cell expansion technology and viruses as immune boosters // *Yakugaku Zasshi.* – 2010. – 130(11). – P. 1519–26.
3. *Iga-Murahashi M., Hijikata Y., Suehiro Y. et al.* New strategies in anti-tumor immunotherapy // *Rinsho Ketsueki.* – 2010. – 51(11). – P. 1654–60.
4. *O'Neill D.W.* Dendritic cells and T cells in immunotherapy // *J Drugs Dermatol.* – 2010. – 9(11). – P. 1383–92.
5. *Onishi H., Suzuki H., Chikazawa N. et al.* New immunotherapy against cancer: a therapy to control regulatory T cell // *Fukuoka Igaku Zasshi.* – 2010. – 101(10). – P. 207–14.
6. *Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J.* Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion // *Science.* – 2011. – 331(6024). – P. 1565–70.
7. *Su J.H., Wu A., Scotney E. et al.* Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential // *BioDrugs.* – 2010. – 24(2). – P. 109–29.
8. *Yaguchi T., Sumimoto H., Kudo-Saito C. et al.* The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies // *Int J Hematol.* – 2011. – 93(3). – P. 294–300.

### СПИСОК ИСПОЛЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

|     |                            |
|-----|----------------------------|
| АИТ | – адоптивная иммунотерапия |
| РШМ | – рак шейки матки          |

## НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН





УДК 616,5-003.871:613.165.6

А.П. Безуглый<sup>1</sup>, А.Н. Хлебникова<sup>2</sup>, Е.В. Селезнева<sup>2</sup>, Н.Н. Бикбулатова<sup>1</sup>, П.А. Белков<sup>1</sup>, Г.Э. Баграмова<sup>3</sup>, И.А. Климанов<sup>4</sup>

**УЛЬТРАСОНОГРАФИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АКТИНИЧЕСКОГО КЕРАТОЗА**<sup>1</sup>ООО «Антamed», Москва, Москва<sup>2</sup>ПМГМУ им. И. М. Сеченова, Москва<sup>3</sup>РУДН, Москва<sup>4</sup>ООО «Медикал Клуб Консилиум», Москва**Контактная информация**

Селезнева Елена Владимировна, аспирант кафедры кожных и венерических болезней ФППОВ ПМГМУ им. И.М. Сеченова

адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина 61/2, стр.2; тел. +7 (495) 631-01-63.

e-mail: [selezneva-elena@mail.ru](mailto:selezneva-elena@mail.ru)

Статья поступила 20.07.2012, принята к печати 09.07.2013.

**Резюме**

Актинический (солнечный) кератоз – предраковый дерматоз, возникающий, преимущественно у людей с I–II фототипами на открытых участках кожи под действием УФ-излучения. Целью настоящего исследования явилось выявление ультразвуковых признаков актинического кератоза и сопоставление ультразвуковой, патоморфологической и иммуногистохимической картин в зоне обследования. В исследование были включены 20 пациентов с клинически диагностированным актиническим кератозом на коже лица. С помощью ультразвукового сканирования было исследовано 35 патологических участков. Из 20 очагов актинического кератоза после проведения ультразвукового сканирования был взят биопсийный материал для гистологического и иммуногистохимического исследований. Эпидермис на сканограмме определялся в виде полосы повышенной эхогенности, шириной  $119,8 \pm 26,4$  мкм. Толщина дермы составила  $1645,8 \pm 335,8$  мкм, при этом в её структуре отмечались гипохойчные участки полосовидной формы, которые в 43 % случаев располагались преимущественно в верхних отделах, в 51 % случаев – в верхних и средних отделах, в 6% случаев – по всей дерме. Средняя толщина гипохойчных зон составила  $749 \pm 372,5$  мкм, а их акустическая плотность –  $6,4 \pm 3,9$  Ед. При сопоставлении результатов ультразвукографии и данных морфологического исследования было констатировано статистически достоверное увеличение толщины эпидермиса на сканограммах, по сравнению с контролем, при гипертрофическом и пролиферативном типах актинического кератоза ( $p < 0,05$ ). При атрофическом типе толщина эпидермиса незначительно отличалась от контроля ( $p > 0,05$ ). В дерме во всех случаях наблюдали явления эластоза, локализация которых в различных ее отделах при иммуногистохимическом исследовании совпадала с расположением гипохойчных зон при ультразвукографии. Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что ультразвуковая картина актинического кератоза характеризуется утолщением эпидермиса, дермы и появлением полосовидных гипохойчных зон в дерме, располагающихся на разных ее уровнях. Отмечается выраженное снижение акустической плотности гипохойчных зон при АК, по сравнению с группой контроля. При сопоставлении данных иммуногистохимического исследования и результатов ультразвукографии, выявлено совпадение локализации участков эластоза с расположением гипохойчных зон.

**Ключевые слова:** актинический кератоз, солнечный эластоз, эластин, ультразвукография.

A.P. Bezugliy, A.N. Khlebnikova, E.V. Selezneva, N.N. Bikbulatova, P.A. Belkov, G.E. Bagramova, I.A. Klimanov

**ULTRASONOGRAPHIC FEATURES OF ACTINIC KERATOSIS**

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

M.F. Vladimirovskiy Moscow Region Clinical Research Institute

LCE «Antamed», Moscow

LCE «Medical Club Consilium», Moscow

**Abstract**

Actinic keratosis (AK) is a premalignant lesion caused by ultraviolet (UV) radiation and characterized by epithelial and connective tissue alterations. Objective and Methods: To identify ultrasound features of actinic keratosis, to compare ultrasonographic features with histological and immunohistochemical signs of actinic keratosis. This study included 20 patients with clinically diagnosed actinic keratosis on the face. It has been investigated 35 actinic keratoses by ultrasound scanning. After the ultrasound scanning a biopsy from 20 lesions of actinic keratosis for histological and immunohistochemical researches were taken. (20 skin biopsies were taken from the same lesion examined by UBM and were stained for histological examination and immunohistochemical researches.) The epidermis on the scans was determined as a band of increased echogenicity, a depth of  $119,8 \pm 26,4$  mkm. The thickness of the dermis was  $1645,8 \pm 335,8$  mkm, while in its structure there were hypoechoic areas band-like form, which in 43% of cases were located mainly in the upper parts of the dermis, in 51% of cases – in the upper and middle parts of the dermis, in 6% of cases – throughout the dermis. The mean thickness of hypoechoic areas was  $749 \pm 372,5$   $\mu$ m, and their acoustic density was  $6,4 \pm 3,9$  units. It was statistically significant increase in the thickness of the epidermis on the scans in hypertrophic and proliferative types of actinic keratoses compared with controls ( $p < 0,05$ ). In atrophic type of actinic keratoses epidermal thickness was not significantly different from the control ( $p > 0,05$ ). Elastosis was present in the different parts of the dermis of all cases of actinic keratosis. The dermis in all cases observed phenomena elastosis, the localization of which in its various departments under immunohistochemical study coincided with the location of hypoechoic areas in ultrasonography. Ultrasound depth measurements compared to histological depth measurements.

**Key words:** actinic keratosis, solar elastosis, elastin, ultrasonographia.

## Введение

Ультрасонография – неинвазивный и безопасный метод исследования тканей, в основе которого лежит отражение ультразвуковой волны от границы раздела двух сред с различными акустическими свойствами. Благодаря информативности и возможности количественной оценки наблюдаемых объектов, ультразвуковое исследование широко применяется в клинической практике.

В ряде случаев данные ультразвукового исследования служат основанием для установления диагноза, в других – ультразвук используется для уточнения клинических данных. Основная задача УЗИ – изучение структуры биологического объекта, его расположения и размеров, характеристика распределения элементов ткани и взаимоотношений с окружающими тканями и органами. В последние годы ультразвуковое исследование начали активно использовать и в дерматологии. Для дерматологической практики применяют датчики с частотой генерации импульсов 20 или 22; 30; 50; 75 и 100 МГц. [6; 13] Высокочастотный ультразвук обеспечивает высокую разрешающую способность, что позволяет дифференцировать эпидермис и дерму, подкожную жировую клетчатку в норме и при патологии.

Качественную оценку структуры кожи проводят при визуальном изучении ультрасонографической картины, а количественно измеряют размеры объектов, толщину слоев кожи и эхогенность [6; 13; 14]. Размеры наблюдаемых структур кожи при ультразвуковом сканировании измеряют в микрометрах (1 мкм = 1·10<sup>-6</sup>м). Эхогенность или акустическая плотность прямо пропорционально зависит от интенсивности отраженных ультразвуковых волн и измеряется в условных единицах в диапазоне от 0 до 255. При двухмерном В-сканировании интенсивность отраженного сигнала в каждой точке эхограммы преобразуется в определенный цвет пикселя и цветовая шкала включает 256 различных цветов или 256 градаций серого цвета. Разрешающая способность метода достаточно высока от 72 (при 22 МГц) до 16 (при 100 МГц) мкм, глубина сканирования обратно пропорциональна частоте и варьирует от 10 до 1,5 мм [6; 7; 12]. УЗ-исследование опухолей кожи дает ценную диагностическую информацию при определении глубины распространения, характера роста и границ опухолей кожи [4; 5; 8; 10].

Актинический (солнечный) кератоз – предраковый дерматоз, возникающий преимущественно у людей с I–II фототипами на открытых участках кожи под действием УФ-излучения.

Основным методом его диагностики остается патоморфологическое исследование, при котором выявляют гиперпаракератоз, пролиферацию атипичных кератиноцитов, эластоз в подлежащих отделах дермы. Учитывая преимущественную локализацию актинического кератоза на коже лица, представляется актуальным более широкое использование для его диагностики неинвазивных методов исследования.

**Цель исследования** – выявить ультрасонографические признаки актинического кератоза. Сопоставить ультрасонографическую, патоморфологическую и иммуногистохимическую картины в зоне обследования.

## Материалы и методы

В исследование были включены 20 пациентов, в возрасте от 56 до 73 лет, 4 мужчин и 16 жен-

щин, с клинически диагностированным актиническим кератозом на коже лица. Количество очагов актинического кератоза у одного пациента варьировало от одного (двух) до десяти. С помощью ультразвукового сканирования было исследовано 35 патологических участков. Для ультрасонографической оценки изменений эпидермиса и дермы у наблюдавшихся пациентов с АК использовали специализированную цифровую ультразвуковую систему высокого разрешения DUB (фирма «TRM GmbH», Германия), оснащенную УЗ-датчиком частотой 75 МГц, с разрешением 21 мкм, позволяющим сканировать кожу в глубину до 4 мм. В качестве контроля были исследованы визуально неизменные, контрлатеральные участки кожи. Визуализировали эпидермис, дерму и подкожно-жировую клетчатку. Измеряли толщину и уровень эхогенности эпидермиса и дермы в зоне интереса. Для визуализации и расчета количественных показателей использовали программное обеспечение, разработанное совместно фирмами «TRM GmbH», Германия и «АНТА-Мед» (Россия). Из 20 очагов актинического кератоза после проведения ультразвукового сканирования был взят биопсийный материал для гистологического и иммуногистохимического исследований. Иммуногистохимическая реакция проводилась с антителами к эластину (разведение 1:100, Novocastra, UK). Для визуализации реакции на срезы наносили DAB+ (3,3-диаминобензидин) (DAKO, USA), что позволяло получать специфическую коричневую окраску, после чего в течение 2–5 минут докрашивали гематоксилином Майера.

Статистическая обработка материалов проводилась с помощью методов определения средней величины и доверительного интервала; t-критерия Стьюдента с поправкой для множественных значений.

## Результаты

В результате ультразвукового сканирования толщина кожи в очагах актинического кератоза и контрольной группы составила 1765,6±345 и 1433±244,4 мкм соответственно. Использование УЗ-датчика частотой 75 МГц позволило визуализировать эпидермис и дерму. Эпидермис определялся в виде полосы повышенной эхогенности, хорошо отграниченной от подлежащей дермы, с четким внутренним контуром. В контрольных образцах по всему фронту сканирования отмечалась ровная его поверхность, а толщина составляла от 72 до 120 мкм. В очагах актинического кератоза толщина эпидермиса варьировала от 82 до 190 мкм, при этом на его поверхности визуализировались множественные гиперэхогенные эхосигналы. Среднее значение толщины эпидермиса в контроле составило 87,5±16,7 мкм, в патологических очагах – 119,8±26,4 мкм (рис. 1). Акустическая плотность равнялась 145,3±15,9 Ед и 123±20,4 Ед соответственно (рис. 2.) Учитывая неоднородность ширины эпидермиса при актиническом кератозе, все случаи были разделены на две группы: в 18 очагах (51 %) толщина эпидермиса не превышала 110 мкм – I группа, в 17 очагах (49 %) – была более 110 мкм – II группа. Средняя толщина эпидермиса в I и II группе составляла 96,3±10,3 мкм и 139,7±17,8 мкм соответственно. При гистологическом исследовании очагов I группы выявляли атрофический вариант солнечного кератоза, характеризующийся незначительным истончением эпидермиса и слабо выраженным гиперпаракератозом. Во II группе наблюдали гипертрофический и пролиферативный

типы (выраженные гиперпаракератоз и пролиферация атипичных кератиноцитов). При сопоставлении результатов ультразвукографии и данных морфологического исследования было констатировано статистически достоверное увеличение толщины эпидермиса на сканограммах по сравнению с контролем при гипертрофическом и пролиферативном типах актинического кератоза ( $87,5 \pm 16,7$  мкм и  $139,7 \pm 17,8$  мкм,  $p < 0,05$ ). При кератозе атрофического типа толщина эпидермиса незначительно отличалась от таковой в группе контроля ( $87,5 \pm 16,7$  мкм и  $96,3 \pm 10,3$  мкм  $p > 0,05$ ).

Дерма, как в контроле, так и в очагах актинического кератоза, имела четкое отграничение от подкожно-жировой клетчатки и равномерную толщину, которая в среднем составляла  $1345,5 \pm 235,4$  и  $1645,8 \pm 335,8$  мкм соответственно (рис. 1). При этом в структуре дермы визуализировались полосовидные гипозоногенные участки, расположенные в различных её отделах, и определяющиеся в контрольных образцах – в 66 % случаев, в патологических очагах – в 100 % случаев. В группе контроля гипозоногенные зоны отмечались непосредственно под эпидермисом, их толщина составляла от 188 до 680 мкм. В очагах актинического кератоза толщина гипозоногенных зон варьировала от 301 до 2283 мкм, причем в 43 % случаев они определялись только в верхних отделах дермы (рис. 3 А, Б; см. оборот обложки), в 51 % – в верхних и средних (рис. 4 А, Б), и в 6 % – на всю толщину дермы (рис. 5 А, Б). Среднее значение толщины гипозоногенных участков в контроле и патологических очагах составляло  $221,4 \pm 193$  мкм и  $749 \pm 372,5$  мкм (рис. 1), при этом их акустическая плотность равнялась  $19,3 \pm 9,5$  Ед и  $6,4 \pm 3,9$  Ед (рис. 2) соответственно. Акустическая плотность дермы непосредственно под гипозоногенными зонами составляла  $21,1 \pm 10,8$  Ед – в контроле и  $15,1 \pm 6,8$  Ед – в патологических очагах (рис. 2).

Сравнительный анализ средних величин толщины эпидермиса, дермы и зоны эластоза в очагах актинического кератоза и контрольной группы выявил, что участки солнечного кератоза имеют значительно более широкую гипозоногенную область, чем контрольные образцы ( $p < 0,05$ ). Напротив, различие между средними значениями толщины эпидермиса и дермы в сравниваемых группах не достоверно ( $p > 0,05$ ). Также было отмечено статистически значимое снижение акустической плотности гипозоногенных зон при солнечном кератозе по сравнению с визуально неизменными участками кожи ( $p < 0,05$ ). Достоверных различий между эхогенностью эпидермиса и глубоких отделов дермы в контроле и патологических очагах не наблюдалось ( $p > 0,05$ ).

При иммуногистохимическом исследовании в дерме во всех случаях наблюдали явления эластоза, локализация которых в различных её отделах совпадала с расположением гипозоногенных зон при ультразвукографии. Зонам эластоза толщиной  $504,6 \pm 101,4$  мкм соответствовали гипозоногенные области в верхних отделах дермы, средняя ширина которых составила  $521,8 \pm 117,3$  мкм. Зоны эластоза толщиной  $649 \pm 195,3$  мкм совпадали с гипозоногенными областями, локализующимися в верхних и средних слоях дермы. Толщина последних равнялась  $768,3 \pm 204$  мкм. Иммуногистохимическое исследование в образцах с ранее диагностированными гипозоногенными зонами на всем протяжении дермы, выявило аналогичное расположение эластических изменений. При этом среднее значение ширины эластоза и гипозоногенных зон составило  $1829 \pm 454$  мкм и  $1556,5 \pm 438,5$  мкм соответственно (рис. 6).

Толщина узкой, широкой и тотальной зон эластоза при иммуногистохимическом окрашивании значимо не отличалась от аналогичной ширины гипозоногенных зон, выявленных при ультразвуковом сканировании (рис. 2).

### Обсуждение

В результате ультразвукографического исследования отмечалось увеличение толщины эпидермиса и дермы в очагах актинического кератоза по сравнению с визуально неизменными участками кожи. Эпидермис определялся в виде полосы повышенной эхогенности, шириной  $119,8 \pm 26,4$  мкм, над которой визуализировались множественные гиперэхогенные эхосигналы, свидетельствующие о явлениях гиперкератоза. Толщина дермы составила  $1645,8 \pm 335,8$  мкм, при этом в её структуре отмечались гипозоногенные участки полосовидной формы, которые в 43 % случаев располагались преимущественно в верхних отделах, в 51 % случаев – в верхних и средних отделах. Гипозоногенные участки, локализующиеся по всей дерме, визуализировались в 6 % случаев актинического кератоза. Средняя толщина гипозоногенных зон составила  $749 \pm 372,5$  мкм, а их акустическая плотность –  $6,4 \pm 3,9$  Ед. Гипозоногенные зоны в дерме аналогичной толщины  $820 \pm 333$  мкм визуализировались в очагах актинического кератоза ранее [15]. Однако в отличие от полученных нами результатов, авторы отмечали уменьшение толщины эпидермиса и дермы в участках поражения [15].

Ультразвукографическое исследование используют для определения глубины распространения, характера роста и границ опухолей кожи. Так, базальноклеточный рак и меланома на сканограммах определяются в виде солидных, объемных гипозоногенных образований. При этом базалиома чаще всего имеет округлые или овальные очертания и неровные контуры [2], а меланома – неправильную форму с четкими латеральными границами [1]. Структура последней неоднородная, со слабо выраженным эффектом дистального усиления эхосигнала, деформированными артериальными и венозными сосудами [1].

Применение УЗ-сканера позволяет не только визуализировать форму и границы новообразования, оценить размеры и глубину прорастания, но и в некоторых случаях определить его структурные особенности. Так, F. Bobadilla и соавт. при сопоставлении данных ультразвукографии и морфологического исследования базальноклеточного рака кожи отметили совпадение средней толщины опухолей при данных исследованиях [2]. Кроме того, в структуре базалиома определялись множественные гиперэхогенные образования различных форм и размеров, которые при гистологическом исследовании представляли собой кальцификаты, ороговевающие кисты, а также участки некроза опухолевых клеток [11]. Ряд авторов предлагают использовать наличие гиперэхогенных включений в структуре опухоли в качестве дифференциально-диагностического признака, позволяющего различать базальноклеточную карциному и меланому кожи [11]. В дерме во всех случаях наблюдали явления эластоза, локализация которых в различных ее отделах при иммуногистохимическом исследовании совпадала с расположением гипозоногенных зон при ультразвукографии. При этом чем меньше была их акустическая плотность, тем большее количество «эластического материала» отмечалось на гистологических срезах.

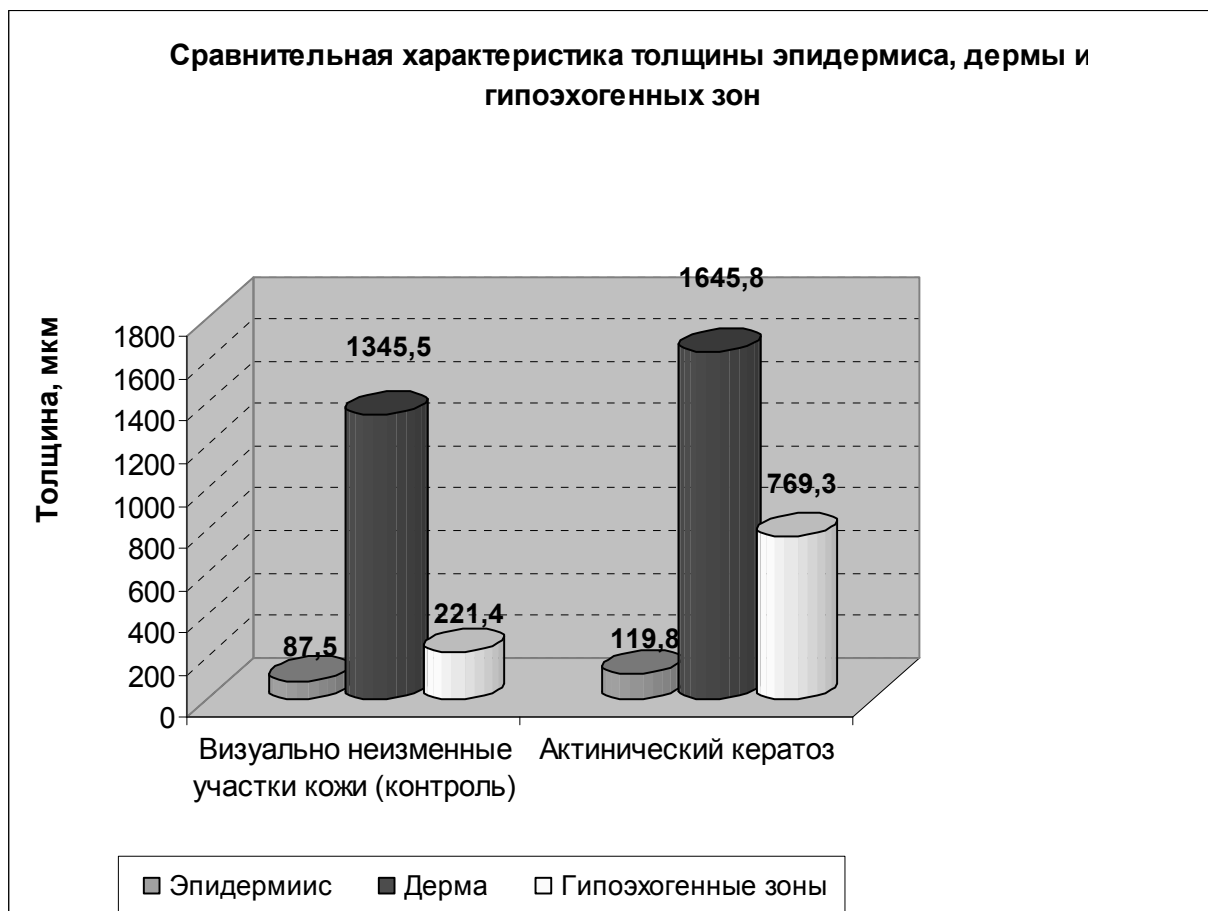


Рис.1. Сравнительная характеристика толщины эпидермиса, дермы и гипозоногенных зон.

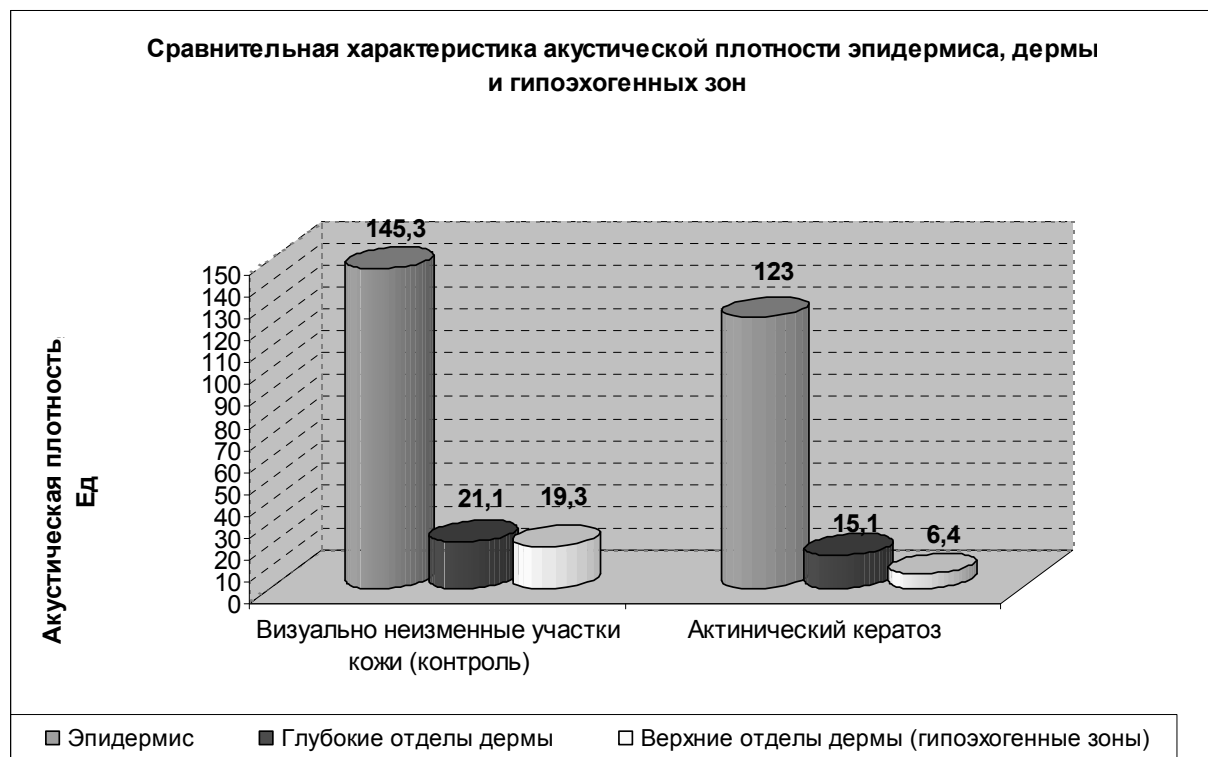


Рис. 2. Сравнительная характеристика акустической плотности эпидермиса, дермы и гипозоногенных зон.

Информативность УЗ-сканирования новообразований кожи оспаривается рядом исследователей. Так, М. Mogensen и соавт. не находили отличий в сканограммах очагов актинического кератоза и базальноклеточного рака [9]. Обе опухоли определялись как гипоехогенные образования округлой или овальной форм с четкими границами. При этом размеры базалиом, выявленные при УЗ-сканировании, значительно превышали таковые в результате последующего морфологического исследования [9]. Необходимо отметить, что данный эксперимент проводился с использованием УЗ-датчика 20 МГц с разрешающей способностью около 80 мкм. Такое разрешение недостаточно для определения различий при исследовании эпидермальных новообразований [9]. Это согласуется с результатами Т. Gambichleri и соавт., исследовавших толщину поверхности распространяющейся меланомы, используя УЗ-датчик 20 МГц и 100 МГц. [3]. В результате их эксперимента было выявлено, а впоследствии и подтверждено гистологически, что применение УЗ-датчика с частотой 20 МГц дает неточную и расплывчатую картину опухоли, а также значительно искажает её границы, чего не происходит при использовании датчика 100 МГц.

### Литература

1. Курдина М.И., Макаренко А., Маркина Н.Ю., Калустов В.Е. Ультразвуковая диагностика новообразований кожи // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2009. – № 3. – С. 52–5.
2. Bobadilla F., Wortsman X., Munoz C. et al. Pre-surgical high resolution ultrasound of facial basal cell carcinoma: correlation with histology // Jemec Cancer Imaging. – 2008. – 8. – P. 163–72.
3. Gambichler T., Moussa G., Bahrenberg K. et al. Preoperative ultrasonic assessment of thin melanocytic skin lesions using a 100-MHz ultrasound transducer: a comparative study // Dermatol Surg. – 2007. – 33. – P. 818–24.
4. Gupta A.K., Turnbull D.H., Foster F.S. et al. High frequency 40-MHz ultrasound. A possible noninvasive method for the assessment of the boundary of basal cell carcinoma // Dermatol Surg. – 1996. – 22. – P. 131–6.
5. Hoffman K., el Gammal S., Matthes U., Altmeyer P. Digital 20MHz sonography of the skin in preoperative diagnosis // Z Hautkr. – 1989. – 64. – P. 851–2, 855–8.
6. Jasaitiene D., Valiukeviciene S., Linkeviciute G. et al. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology // J Eur Acad Dermatol Venerol. – 2011. – 25(4). – P. 375–82.
7. Kaspar K., Vogt M., Ermert H. et al. 100 MHz-Sonographie zur Darstellung des Stratum corneum an der Palmarhaut nach Anwendung verschiedener Externa // Ultraschall in der Medizin. – 1993. – 3(20). – P. 110–4.
8. Lassau N., Spatz A., Avril M.F. et al. Value of high-frequency US for preoperative assessment of skin tumors // Radiographics. – 1997. – 17. – P. 1559–65.
9. Mogensen M., Nuernberg B.M., Forman J.L. et al. In vivo thickness measurement of basal cell carcinoma and actinic keratosis with optical coherence tomography and 20-MHz ultrasound // British Journal of Dermatology. – 2009. – 160. – P. 1026–33.
10. Moore J.V., Allan E. Pulsed ultrasound measurements of depth and regression of basal cell carcinoma after photodynamic therapy. relationship to probability of 1-year local control // Br J Dermatol. – 2003. – 149. – P. 1035–40.
11. Uhara H., Hayashi K., Koga H., Saida T. Multiple Hypersonographic Spots in Basal Cell Carcinoma // Dermatol Surg. – 2007. – 33. – P. 1215–9.
12. Vogt M., Paul B., Scharenberg S. et al. Analysis and measurement of spectral characteristics and spatial resolution of high frequency ultrasound imaging system // Proc, IEEE US Symposium. – 2004. – P. 2137–40.
13. Vogt M., Kaspar P., Altmeyer P. et al. High frequency ultrasound for high resolution skin imaging // Frequenz. – 2005. – 59(5-6). – P. 150–3.
14. Vogt M., Scharenberg R., Moussa G. et al. A new high frequency ultrasound skin imaging system: imaging properties and clinical in vivo results // Acoustical imaging. – 2007. – 28. – P. 137–44.
15. Zane C., Capezzeri R., Sala R. et al. Clinical and Echographic Analysis of Photodynamic Therapy Using Methylaminolevulinat as Sensitizer in the Treatment of Photodamaged Facial Skin // Lasers in Surgery and Medicine. – 2007. – 39. – P. 203–9.

### СПИСОК ИСПОЛЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

|     |                            |
|-----|----------------------------|
| АИТ | – адоптивная иммунотерапия |
| РШМ | – рак шейки матки          |

### Выводы

Ультрасонографическая картина актинического кератоза характеризовалась утолщением эпидермиса и дермы, наличием в различных отделах дермы полосовидной гипоехогенной зоны. Размер и акустическая плотность гипоехогенных зон достоверно отличались от группы контроля ( $p < 0,05$ ).

Гипоехогенные зоны в дерме при актиническом кератозе визуализировались в 43 % случаев преимущественно в верхних отделах, в 51 % случаев в верхних и средних отделах, в 6% случаев на всю толщину дермы.

При сопоставлении данных иммуногистохимического исследования и результатов ультрасонографии выявлено совпадение локализации участков эластоа с расположением гипоехогенных зон.

При сопоставлении морфологической и ультразвуковой картин отмечалось увеличение ширины эпидермиса в 1,5 раза при ультрасонографии по сравнению с группой контроля, что наблюдали при гипертрофическом и пролиферативном типе актинического кератоза.

## К 100-летию со дня рождения В.В. Киселёва

18 сентября 2013 года исполняется 100 лет со дня рождения Виктору Васильевичу Киселёву.

В.В. Киселёв – выпускник Московского химико-технологического института имени Д.И. Менделеева (1936). Научная деятельность, в основном, прошла во ВНИХФИ имени С. Орджоникидзе, где в апреле 1941 года он успешно окончил аспирантуру и защитил кандидатскую диссертацию по теме: «Химия алкалоидов дикорастущих маков».

С 23 июня 1941 года и по июнь 1949 года проходил военную службу в должности старшего помощника начальника отделения в Центральной научно-исследовательской лаборатории Главного управления МПВО МВД СССР. Награждён медалями: «За оборону Москвы», «За победу над Германией в Великой Отечественной войне», «30 лет Советской Армии», «20 лет победы в Великой Отечественной войне 1941-1945 гг.», «В память 800 лет Москвы», «За доблестный труд в ознаменование 100-летия со дня рождения В.И. Ленина».

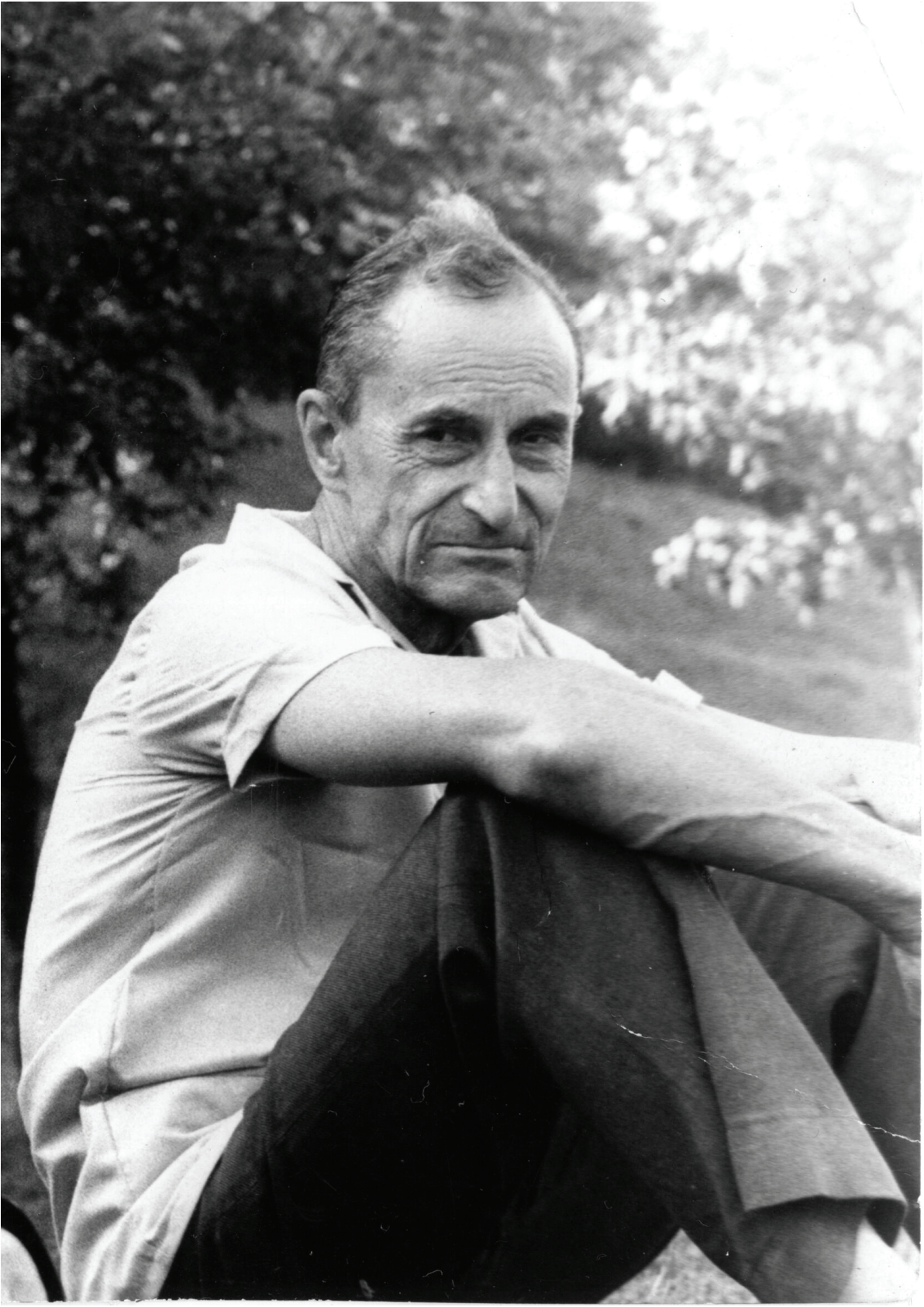
С апреля 1965 по июнь 1985 года В.В. Киселёв работал в Онкологическом научном центре в должности руководителя лаборатории химии природных соединений. В 1980 году защитил докторскую диссертацию в области колхициновых алкалоидов.

В.В. Киселёв принадлежит к школе советских химиков-алкалоидников, основанной академиком А.П. Ореховым, в 1949 году он совместно с Г.П. Меньшиковым выделил неизвестный до тех пор алкалоид колхамин и внедрил его в медицинскую промышленность в качестве противоопухолевого препарата. В дальнейшей работе было установлено строение этого алкалоида, а также разработан и передан в производство метод его получения. С целью поиска новых противоопухолевых препаратов, В.В. Киселёв начал получение синтетических соединений на основе колхицина.

Сотрудники лаборатории под руководством В.В. Киселёва занимались исследованиями, посвященными поиску и выделению природных соединений и их изучению с целью разработки новых лекарственных препаратов.

Глубокоуважаемый Виктор Васильевич, посвятив себя науке, Вы многие годы дарили свой талант, труд, тепло души однажды избранному делу.

В день Вашего юбилея, дорогой Виктор Васильевич, коллектив Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина сердечно поздравляет Вас с 100-летним юбилеем, желаем Вам крепкого здоровья, счастья Вам и Вашей семье и, конечно же, долгих лет жизни.



## ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

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

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

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

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

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

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

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

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

Все страницы должны быть пронумерованы. Номер страницы должен быть расположен внизу справа, 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 рубрики указаны цель исследования, материалы и методы, полученные автором результаты и основные выводы. В конце резюме автор приводит **Ключевые слова** работы (не более 5). Рекомендуемый объем реферата – 500–1000 печатных знаков. Отступление от этой схемы допустимо только в отношении обзорных статей.

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

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



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 смаскетированы 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 указаным выше требованиям по качеству.

Графики и схемы нельзя перегружать надписями. Подпись к рисунку должна быть лаконичной, точно соответствовать его содержанию. Если несколько рисунков идут под общей надписью, то сначала приводят ее, а затем названия отдельных рисунков под русскими буквами.

В подписях под рисунками должны быть объяснены все кривые, буквенные, цифровые и другие условные обозначения. В подписях под микрофотографиями следует указать методику микроскопии, увеличение, метод окраски материала. Если иллюстрация заимствуется из другого источника, в конце подписи следует дать на него ссылку. На печатном экземпляре рисунки нумеруют, помечают верх и низ.

Все формулы должны быть тщательно выверены автором, набраны или встроены в формат текстового редактора. В формулах необходимо различать строчные и прописные, латинские и греческие, подстрочные и надстрочные буквы. Используемые автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

Список литературы должен быть кратким и содержать не более 20 ссылок для статей, посвященных экспериментальным и клиническим исследованиям, и не более 100 ссылок для обзорных статей. Номера ссылок указывается в квадратных скобках через точку с запятой.

В списке литературы в алфавитном порядке перечисляются курсивом *фамилии и инициалы авторов* на русском языке, затем на иностранных языках.

Все библиографические ссылки в тексте должны быть пронумерованы в соответствии с их положением в списке литературы. Фамилии иностранных авторов приводятся в оригинальной транскрипции. В список литературы не включаются ссылки на неопубликованные работы и учебники. Ссылки должны быть тщательно выверены авторами, которые несут ответственность за правильность приведенных данных.

Если авторов не более четырех, они упоминаются все, при большем числе авторов перечисляются первые три, далее пишется *и др.* или *et. al.*

При ссылке на книгу следует указывать авторов, затем название книги, номер издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы (если автор ссылается на всю книгу, то пишется 150 с., если на ее часть, то указывается С. 143-8.), например:

Руководство по гематологии под ред. А.И. Воробьева. – Т. 2. – М.: Ньюдиамед, 2004. – 277 с.  
*Bihrl R., Libertino J.A.* Renal cell cancer with extension into the vena cava. In: Dekernion B.J., 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.). Гинекология 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).

*Логинова Л.Г.* Сущность результата дополнительного образования детей // Образование: исследовано в мире: междунар. науч. пед. интернет-журн. 21.10.03. URL: <http://www.oim.ru/reader.asp?nomer=366> (дата обращения: 17.04.07).

Рынок тренингов Новосибирска: своя игра [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://nsk.adme.ru/news/2006/07/03/2121.html>

В тексте рекомендуется использовать международные названия лекарственных средств, которые пишутся с маленькой буквы. Торговые названия препаратов пишутся с большой буквы.

В конце статьи должны стоять подписи всех авторов. На отдельном листе авторам следует указать почтовый адрес для переписки, включающий почтовый индекс, телефон(ы), факс и адрес электронной почты. Все статьи, поступившие в редакцию, подлежат рецензированию. Рецензенты для каждой статьи назначаются редакционной коллегией. Если рецензенты и редакторы предлагают исправить работу, то копия с таким предложением отправляется автору. Эта копия возвращается вместе с переработанным экземпляром, который представляется на бумаге и в электронном виде.

Редакция оставляет за собой право отклонить работу из-за несоответствия профилю и требованиям журнала, достоверности и объективности данных, наличия ошибок или неподкрепленных достоверными фактами деклараций, противоречащих современным научным представлениям и опыту.

Редакция журнала осуществляет научное и литературное редактирование статей, обязуется информировать авторов обо всех смысловых изменениях, возникающих при редактировании их работ (это не касается литературной правки).

Статьи, ранее опубликованные в других журналах или сборниках, не будут приняты к публикации.

*С уважением,  
главный редактор А.Ю. Барышников*

### УЛЬТРАСОНОГРАФИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АКТИНИЧЕСКОГО КЕРАТОЗА

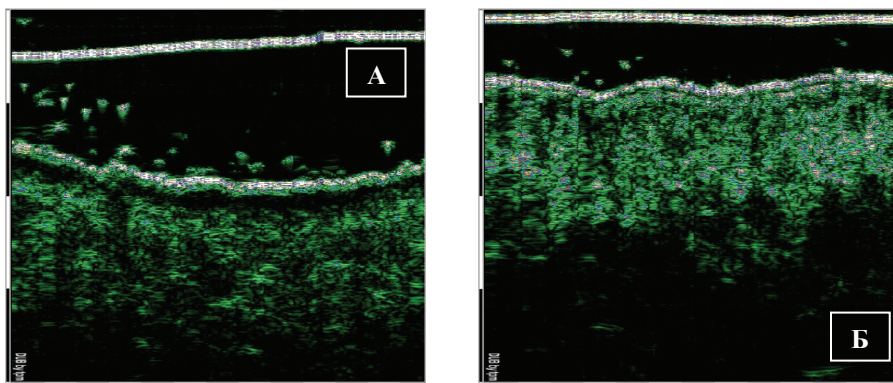


Рис. 3. Сканограмма.

А: актинического кератоза – узкая субэпидермальная гипоэхогенная полоса.  
Б: контрлатерального визуально неизмененного участка кожи. Датчик 75 МГц.

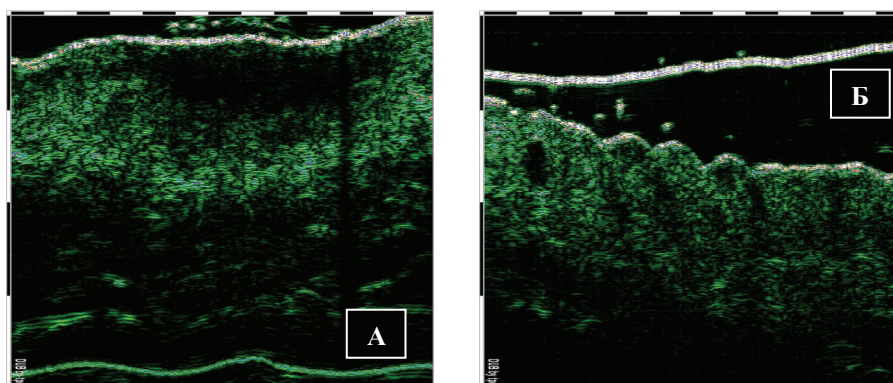


Рис. 4. Сканограмма.

А: актинического кератоза – широкая гипоэхогенная зона в верхних отделах дермы.  
Б: контрлатерального визуально неизмененного участка кожи. Датчик 75 МГц.

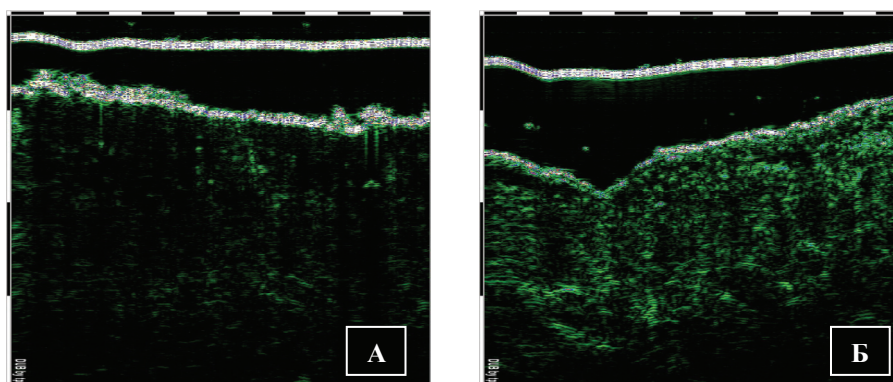


Рис. 5. Сканограмма.

А: актинического кератоза – значительное снижение эхогенности всех слоев дермы.  
Б: контрлатерального визуально неизмененного участка кожи. Датчик 75 МГц.

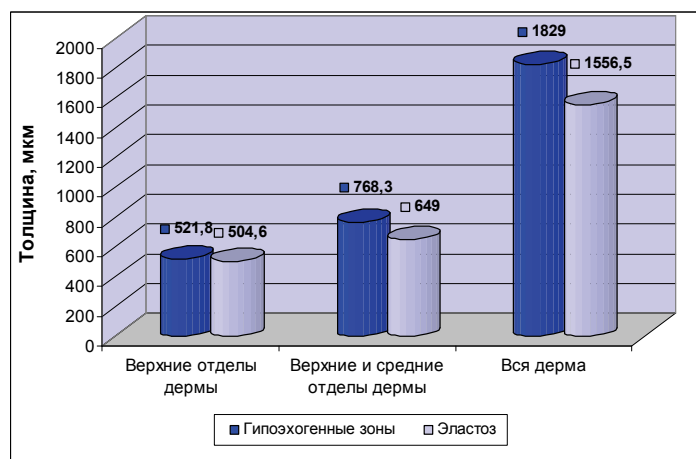


Рис. 6. Распределение гипоэхогенных зон в очагах актинического кератоза.