



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

Материалы II Всероссийской научной конференции
с международным участием «**НАНООНКОЛОГИЯ**»,
Тюмень, 26–28 сентября 2010 г.



**Russian Journal
of Biotherapy**

3/2010

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№3 Том 9 2010 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

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

Редакционный совет

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

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

E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru

Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 6,5 усл.-печ. листов,

подписано в печать 21.09.2010

Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел. +7 (495) 324 24 70; ronc@list.ru

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

Принт-менеджмент:

Типография «Огни Москвы»

Тел.: +7 (494) 933-87-78

info@ognimsk.ru, www.ognimsk.ru

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕЗИСЫ

Материалы II Всероссийской научной конференции с международным участием «Наноонкология», Тюмень, 26–28 сентября 2010 г.....	3
---	---

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>В.Л. Карапетян, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, С.О. Никогосян, В.В. Кузнецов</i> ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА KI-67 В ТКАНИ ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ I–II СТАДИЙ	31
--	----

<i>А.Е. Бармашов, К.Д. Никитин, И.Н. Михайлова, Л.Ф. Морозова, А.Н. Иншаков, К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников</i> ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА МЕТОДОМ ELISPOT У БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ВАКЦИНУ «МЕЛАВАК»	37
---	----

<i>Н.В. Голубцова¹, И.Н. Михайлова¹, В.В. Новиков², К.А. Барышников¹, Н.Б. Преснякова², Е.В. Огородникова¹, Н.Н. Петенко¹, К.А. Парсункова³, О.С. Бузова¹, Г.З. Чкадуа¹, Л.В. Демидов¹, А.Ю. Барышников¹</i> ИЗМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ HLA I КЛАССА, АНТИГЕНА CD8 И РАСТВОРИМОГО КОМПЛЕКСА HLA-I-CD8 У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ	41
---	----

<i>И.В. Манина, Н.М. Перетолчина, Н.С. Сапрыкина, А.М. Козлов, И.Н. Михайлова, А.Ю. Барышников</i> ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ С ПОМОЩЬЮ ЦЕЛНОКЛЕТОЧНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН, СЕКРЕТИРУЮЩИХ GM-CSF	47
---	----

<i>О.В. Хугаева¹, Н.П. Яворская¹, И.С. Голубева¹, М.А. Кортава¹, Д.В. Соколова¹, Е.В. Тазина¹, Е.В. Игнатьева¹, А.П. Полозкова¹, Н.А. Оборотова¹, А.Ю. Барышников¹, И.И. Краснюк²</i> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МИТОКСАНТРОНА	51
---	----

<i>Д.В. Соколова, Е.М. Трещалина, Н.В. Андропова, Е.В. Степанова, В.А. Голубева, А.Ю. Барышников</i> МОДЕЛИ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ IN VIVO ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ АНТИГЕНА MUC1	55
--	----

<i>М.Н. Якунина, Я.В. Вишневская, Е.М. Трещалина</i> ТАКСОТЕР И ДОКСОРУБИЦИН В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ДИФфуЗНОГО И ИНФИЛЬТРАТИВНО-ОТЕЧНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СОБАК. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	61
--	----

<i>М.А. Чекалова, В.В. Кузнецов, М.Н. Колпакова</i> ВОЗМОЖНОСТИ ТРЕХМЕРНОЙ ЭХОГРАФИИ В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ТЕЛА МАТКИ	65
--	----

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Л.В. Плетнева, А.Ф. Лазарев</i> ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ	69
--	----

<i>В.А. Хайленко^{1,2}, В.А. Агафонов¹, Т.Х. Мень², Е.Ф. Ткачева¹, А.В. Дударев³, А.М. Сдвижков⁴, П.Г. Богуш⁵, Э.И. Мордохович⁶</i> ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ И СИФИЛИС: ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И СОВРЕМЕННОСТЬ	77
--	----

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

<i>И.С. Давиденко</i> НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	87
--	----

ТЕЗИСЫ

Материалы IX Всероссийской научной конференции «ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ», Нижний Новгород, 18–19 мая 2010 г.....	99
--	----

Правила оформления статей	29-30; 36
Натан Танфелевич Райхлин. К 85-летию со дня рождения	102
Список сокращений	104

Материалы II Всероссийской научной конференции с международным участием «Наноонкология», Тюмень, 26–28 сентября 2010 г.

ТЕЗИСЫ

А.Г. Акопджанов¹, Э.В. Манвелов¹, А.И. Сергеев²,
В.Ю. Науменко¹, А.В. Семейкин¹, Н.Л. Шимановский¹
**СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ
СЛОЖНОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (МАГНЕТИТА),
ПРИМЕНЯЕМОГО В ОНКОЛОГИИ**

¹Российский государственный медицинский университет, Москва

²НИИ химической физики РАН, Москва

Наночастицы магнетита Fe_3O_4 ($\text{FeOxFe}_2\text{O}_3$), а также системы, в которых магнитные наночастицы распределены в немагнитной среде, представляют интерес для современной медицины и фармакологии при разработке методов лечения и диагностики различных заболеваний, в том числе онкологических. Данные методики основаны на использовании специфических свойств материалов в наноразмерном состоянии. Особый интерес представляют наночастицы, размер которых соизмерим с размером магнитного домена, так как в этом случае они обладают суперпарамагнитными свойствами.

В задачи исследования входило получение наночастиц магнетита, которые образуют устойчивую коллоидную систему, удовлетворяющую требованиям биосовместимости, и имеющую фиксированное физиологическое значение рН.

Получение наночастиц магнетита осуществляли с помощью реакции Элмора. Для стабилизации наночастиц использовали лимонную кислоту, которая не обладает сильными поверхностно-активными свойствами, но приемлема с биологической точки зрения и цитрат натрия.

Цитотоксичность наночастиц оксида железа определяли на культуре клеток HeLa (эпителиоидный рак шейки матки человека) при времени инкубации 24 ч с помощью МТТ-теста. Жизнеспособность клеток определялась по сравнению с контрольной пробой без добавления наночастиц. Определение времен спин-спиновой релаксации протонов проводили на ЯМР-релаксометре РС-120 фирмы «Брукер».

Показано, что цитотоксичность наночастиц снижается при увеличении их оболочки за счет цитрата натрия. Раствор полученных наночастиц (60 г/л) размером 8,2 нм уменьшал времена релаксации T1 и T2 растворов воды и сывороточного альбумина. При этом в случае T1 эффект был статистически значимо выше по сравнению с препаратом сравнения Резовистом.

По результатам исследований сделан вывод, что полученные суперпарамагнитные наночастицы магнетита со средним диаметром 8,2 нм обладают низкой цитотоксичностью, позволяют изменять времена релаксации протонов и, тем самым, контрастировать опухолевые образования и одновременно проводить магнитную гипертермию.

Н.Ю. Анисимова, В.А. Даванков,

М.И. Будник, М.В. Киселевский

**НАНОПОРИСТЫЕ СОРБЕНТЫ,
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ДЕТОКСИКАЦИИ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ
С СЕПСИСОМ И СЕПТИЧЕСКИМ ШОКОМ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования. Тяжелый сепсис и септический шок являются главными причинами летальности

онкологических больных в отделениях интенсивной терапии. Липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий играет ключевую роль в развитии синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) и сепсиса, инициируя каскад гиперпродукции провоспалительных медиаторов. Для элиминации медиаторов воспаления у септических больных применяют различные методы экстракорпоральной детоксикации, наиболее перспективным из которых является гемосорбция. Целью настоящего исследования было определение сорбционных характеристик трех типов новых сорбентов серии Стиросорб, относящихся к классу нанопористых сверхсшитых полистиролов и являющихся продуктом современных нанотехнологий.

Материалы и методы. Исследованы сорбенты Стиросорб 414, 514, 516. Структура гранул тестируемых сорбентов характеризуется наличием наноразмерных пор (3–30 нм) и громадной удельной поверхностью (порядка 1000 м²/г).

Для оценки способности сорбентов элиминировать медиаторы воспаления их инкубировали с растворами, содержащими цитокины и ЛПС. Концентрацию ЛПС определяли с помощью LAL-теста (Nycult biotech-nology, The Netherlands), а содержание цитокинов – методом ИФА (Bender MedSystems, USA).

Кроме того, оценивалась биосовместимость сорбентов – их влияние на структурные и функциональные изменения клеток крови после коинкубации с тестируемыми сорбентами *in vitro*.

Результаты и выводы. Все 3 исследованных сорбента обладают способностью эффективно (более чем на 50 %) снижать уровень ЛПС, ИЛ-1β, ИЛ-10, ФНОα, ФНОβ в изотоническом растворе, но наиболее высокую активность проявил Стиросорб 516. Полученные данные указывают на отсутствие достоверных негативных последствий для клеток в результате длительного контакта с испытуемыми сорбентами. Так интенсивность гемолиза не превышала 22 %, а гибель лейкоцитов – 13 %.

Таким образом, исследованные сорбенты Стиросорб 414, 514, 516 характеризуются хорошими показателями биосовместимости и высокой сорбционной активностью относительно молекул, инициирующих и опосредующих развитие ССВР, а следовательно, могут рассматриваться в качестве перспективных гемосорбентов для экстракорпоральной детоксикации при лечении больных с сепсисом.

В.П. Баклаушев^{1,2*}, Г.М. Юсубалиева¹, О.И. Гурина¹,
Н.Ф. Гриненко¹, И.В. Викторов¹, В.П. Чехонин^{1,2}

**АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
К ЭКСТРАКЛЕТОЧНОМУ ФРАГМЕНТУ
КОННЕКСИНА-43**

В ОЧАГ ВНУТРИМОЗГОВОЙ ГЛИОМЫ

¹ФГУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского» Росздрава, Москва

²Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

*e-mail: gaukhar@gaukhar.org

Коннексин-43 (Cx43) – структурный компонент щелевых контактов между астроцитами, участвующими в функциях гематоэнцефалического барьера (N. Prochnow, 2008).

Существуют данные о высокой способности к миграции Сх43-положительных клеток С6-глиомы и их устойчивости к оксидативному стрессу и другим повреждающим факторам, чем Сх-43 негативные (D.C. Bates, 2007). Последнее делает интересным исследование Сх43 в рамках концепции резистентных к химио- и радиотерапии популяций клеток глиомы.

Целью работы было испытание полученных нами моноклональных антител к экстраклеточному фрагменту Сх43 (Mab Сх43) *in vitro* на культурах Сх43-положительных клеток и *in vivo* на животных с экспериментальной интракраниальной глиомой С6.

Материалы и методы. Моделирование глиобластомы выполняли методом стереотаксической имплантации клеток линии С6 (5×10^5 на крысу) в стриатум 20 самок крыс Вистар.

Очищенные из асцита Mab Сх43 и неспецифические IgGm конъюгировали с ^{125}I (37 МБк на 200 мкг белка) с помощью Иодогена (Sigma). Флюоресцентное мечение Mab Сх43 и неспецифических IgG мыши проводили с помощью Alexa Fluor 660 Protein Labelling kit (Invitrogen). Детекцию флюоресценции на срезах проводили с помощью конфокальной микроскопии на приборе Leica TCS SP5 STED (Институт биологии развития им. Н.К. Коляцова РАН).

Результаты и выводы. В живой культуре низкодифференцированных глиом Mab Сх43 визуализировали Сх43-положительные клетки с флюоресценцией мембранных коннексонов.

В экспериментах *in vivo* Mab Сх43 в бедренную вену крысам с глиомой С6 в первом случае, вводили Mab Сх43- ^{125}I , а во втором – Mab Сх43 с Alexa Fluor 660. В обоих случаях детектировали Mab Сх43 в очаге глиомы спустя 48 ч после их введения. В случае радиоизотопной метки наблюдали накопление 0,27 % от введенной дозы в ткани полушария с глиомой, почти в 5 раз больше, чем неспецифических IgGm.

Накопление Mab Сх43 с Alexa Fluor 660 наблюдается в дедифференцированных астроцитах перитуморальной зоны – астробластах. В результате проведенных исследований подтверждено, что полученные нами Mab Сх43 специфически захватываются живыми Сх-43-позитивными клетками глиомы и астробластами перитуморальной зоны *in vivo*. Адресная доставка в перитуморальную область с помощью Mab Сх43 имеет очевидные перспективы.

Во-первых, при хирургической резекции опухоли правильно определить ее границы с учетом всех имеющихся участков перивазальной и периневральной инвазии.

Во-вторых, именно в перитуморальной области локализуются стволовые опухолевые клетки, поддерживающие пул активно мигрирующих радио- и химиорезистентных клеток глиомы.

С помощью полученных нами антител можно пытаться доставить в клетки перитуморальной зоны как цитостатические препараты, так и терапевтические гены.

М.А. Барышникова¹, Л.И. Минаева², Г.М. Сухин¹,
А.В. Иванов¹, М.М. Кабачник², И.П. Белецкая³,
Г.В. Пономарев³

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА Е6 *IN VITRO*

¹РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

³Институт биомедицинской химии им. Ореховича
РАМН, Москва

Цель работы – изучить цитотоксическое действие трех новых производных хлорина е6 *in vitro* на клетках аденокарциномы яичника человека SKOV-3 с помощью МТТ-теста.

Материалы и методы. Препараты:

(I) 15(2),17(3)-диметилловый эфир 13(1)-N-(2-аминоэтил) амида хлорина е6 (шифр min 341, M=666.80);

(II) 15(2),17(3)-диметилловый эфир 13(1)-N-{2-[N-(Диэтоксифосфорил)амино]этил} амида хлорина е6 (шифр Min 284, M=802.90);

(III) (2),17(3)-диметилловый эфир 13(1)-N-{N-[(Диэтоксифосфорил)(изопропил)метил]амино}этил)амид хлорина е6 (шифр min285, M=859.0015).

Препараты растворяли в 96% этиловом спирте, а затем в физ.растворе. ФДТ-индуцированная фототоксичность определялась на клетках с помощью МТТ-теста, а выживаемость клеток рассчитывалась по формуле: $\text{Выживаемость (\%)} = \frac{\text{ОП}_{\text{опыт}}}{\text{ОП}_{\text{контроль}}}$. Клетки сажали в 96-луночные плоскодонные планшеты по 4×10^4 клеток в 180 мкл полной среды RPMI-1640 на лунку. После прикрепления клеток, в лунки добавляли по 20 мкл исследуемых препаратов в различных концентрациях. Планшеты с клетками инкубировали в течение 40 мин, затем клетки отмывали от невключившегося препарата. После чего клетки облучали с помощью аппарата «АФС 660» (ООО «Полироник»), плотность энергии – 4,5 Дж/см². Планшеты с облученными клетки помещали в инкубатор при 37 °С 5% CO₂, и через 24 ч проводили МТТ-тест. В качестве контроля использовали клетки, которые не обрабатывали препаратами и не облучали.

Результаты и выводы. При обработке опухолевых клеток препаратом (I) в концентрациях 6,67 мкг/мл и 3,335 мкг/мл выживаемость клеток составляет 15 %, в концентрациях 0,667 мкг/мл, 0,3335 мкг/мл и 0,0667 мкг/мл – 17 %, 24 % и 81 % соответственно. При инкубации опухолевых клеток с препаратом (II) в концентрации 1,606 мкг/мл выживаемость клеток составляет 17 %, в концентрации 0,803 мкг/мл – 31 %, 0,16 мкг/мл – 99 %, 0,08 мкг/мл – 100 %. При инкубации опухолевых клеток с препаратом (III) в концентрации 8,59 мкг/мл выживаемость клеток составляет 16 %, в концентрациях 4,259 мкг/мл, 0,86 мкг/мл, 0,426 мкг/мл, 0,086 мкг/мл и 0,043 – 15 %, 41 %, 64 %, 68 % и 94 % соответственно. Таким образом, все три исследуемых препарата оказывали выраженный дозозависимый цитотоксический эффект.

Д.А. Безруков, Е.Г. Дубовик, А.П. Каплун, В.И. Швец ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГОМОГЕНИЗАТОРА ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТЕРИЧЕСКИ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЛИПОСОМ С ДОКСОРУБИЦИНОМ

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

Задачи исследования. В исследовательской практике для формирования дисперсий термочувствительных липосом часто используется метод экструзии через ядерные фильтры при нагревании выше температуры фазового перехода используемой смеси липидов.

Данный метод обеспечивает заданный размер липосомальных наночастиц и их высокую монодисперсность, однако объемы обрабатываемых образцов для лабораторных экструдеров, как правило, невысоки и для удовлетворения потребности в препарате при проведении доклинических и клинических испытаний требуется выбор оборудования с большей производительностью.

В данной работе исследуется формирование исходной дисперсии термочувствительных липосом с сульфатом аммония (предназначенной для последующей активной загрузки доксорубицином) при помощи гомогенизатора высокого давления.

Материалы и методы. Для получения липосом использовали DPPC, DSPC, PEG-2000-DSPE фирмы Lipoid (Германия), доксорубин гидрохлорид ФСП 42-0240-2570-02 (Биолек, Украина); сульфат аммония (Химмед, Россия). Моноламелярные липосомы получали циклической обработкой липидной дисперсии (DPPC:DSPC:DSPE-PEG-2000:Chol 9:1:0.02:0.23; 39.5 мг/мл по липидам в 250 мМ растворе сульфата аммония) на гомогенизаторе высокого давления EmulsiFlex-C5 (Avestin Inc., Canada) при 150 МПа. После 10, 20, 30 и 40 циклов обработки отбирали часть дисперсии и определяли средний размер и распределение липосомальных частиц с помощью анализатора Delsa Nano (Beckman Coulter, Germany). Далее для каждого образца проводили формирование градиента сульфата аммония разбавлением и загружали доксорубин активным способом в течение 1 ч при 50 °С. Отделение липосом от низкомолекулярных веществ для спектрофотометрического определения степени включения активной субстанции во внутренний объем липосом проводили гель-фильтрацией на колонках NAP-5 Sephadex G-25 (GE Healthcare, Великобритания).

Результаты и выводы. Показано, что, в отличие от экструдера, термостатирование гомогенизатора не требуется. Одновременно приемлемыми размерами частиц и монодисперсностью обладает липосомальная дисперсия, обрабатываемая при давлении 150 МПа в течение 20 циклов, что соответствует производительности по первичной дисперсии 90 мл/ч. Средний размер липосом в указанном образце 60–80 нм, степень включения доксорубина (0,4 мг/мл) 96 %, соотношение субстанция/липиды 0,2 (масс).

*Т.В. Белова¹, Е.С. Плеханова¹, Д.В. Новиков¹,
А.В. Калугин¹, Е.Ю. Конторщикова², В.В. Новиков¹*
**ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ
ОБНАРУЖЕНИЯ**

**МРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ ГЕНОВ
ОТ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
АДЕНОКАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА**

¹НИИ молекулярной биологии и региональной биологии
ННГУ им Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

²Нижегородская государственная медицинская академия,
Нижний Новгород

Задачи исследования. Обнаружение экспрессии РТ генов с использованием биочипов является одним из направлений диагностики онкологических заболеваний. Ранее было показано, что мРНК РТ генов выявляются как в опухолевых очагах, так и в периферической крови больных колоректальным раком. Задачей данного исследования стало сравнение встречаемости мРНК РТ генов в опухолевых очагах и периферической крови со степенью дифференциации аденокарциномы кишечника.

Методы исследования. С использованием ОТ-ПЦР было проанализировано 56 образцов периферической крови и 49 образцов опухолевых очагов больных с клинически подтвержденным диагнозом колоректального рака.

Результаты и выводы. Образцы опухолевых очагов и периферической крови исследовали на присутствие мРНК РТ генов MAGE-A, XAGE, SSX, NY-ESO-I и MAGE-C. При сравнении частоты обнаружения исследуемых мРНК в опухолевых очагах аденокарциномы кишечника с различной степенью дифференциации, достоверных различий обнаружено не было. В то же время в периферической крови тех же больных обнаружена тенденция к изменению частоты обнаружения отдельных мРНК РТ генов в зависимости от степени дифференциации аденокарциномы кишечника. Показано, что при высокодифференцированной аденокарциноме мРНК

MAGE-C (43 %) и XAGE (43 %) была обнаружена в 2 раза чаще, чем при умереннодифференцированной (MAGE-C – 21 % и XAGE – 23 %) и низко дифференцированной аденокарциноме (MAGE-C – 25 % и XAGE – 25 %). Для мРНК MAGE-A и SSX генов наблюдалась обратная зависимость. В периферической крови больных с высокодифференцированной умереннодифференцированной аденокарциномой мРНК MAGE-A и SSX выявлялись в 30 % и 16 % соответственно. В образцах периферической крови больных с низкодифференцированной аденокарциномой мРНК MAGE-A и SSX выявлялись чаще в 50 и 75 % случаев. Матричная РНК NY-ESO-I выявлялась только в периферической крови больных с умереннодифференцированной аденокарциномой в 18 % случаев. Таким образом, была продемонстрирована зависимость частоты обнаружения мРНК РТ генов MAGE-A, XAGE, SSX, NY-ESO-I и MAGE-C в периферической крови больных колоректальным раком от степени дифференциации аденокарциномы.

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

*В. Боят, Д.С. Баранов, Е.А. Оганесян,
В.Ю. Балабаньян, Р.Н. Аляутдин*

**ИЗУЧЕНИЕ
ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
НАНОСОМАЛЬНОГО ПАКЛИТАКСЕЛА
НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ JURKAT WT
ММА им. И.М. Сеченова, Москва**

Задачи исследования. Из группы ингибиторов функции микротубулинов паклитаксел применяется наиболее широко. Однако относительно высокая токсичность в сочетании с низкой биодоступностью лимитируют его применение при ряде онкологических заболеваний. Кроме этого, являясь субстратом Р-гр, паклитаксел подвергается активному эффлюксу из опухолевых клеток. Одним из способов повышения биодоступности и преодоления МЛУ является включение цитостатиков в наночастицы. Задачи нашего исследования: создание наносомальной ЛФ на основе сопольмеров молочной и глицероловой кислот, изучение *in vitro* кинетики высвобождения и цитотоксической активности наносомального паклитаксела.

Материалы и методы. Для получения наносомальной формы использовали метод замены растворителя. Содержание паклитаксела в лиофильно высушенных образцах определяли хроматографически. Выход паклитаксела (в процентах) определяли как соотношение паклитаксела, найденного в образце, к введенному в синтез. Был проведен тест высвобождения *in vitro* в среде, имитирующей внутриклеточную жидкость. Цитотоксическую активность наночастиц с паклитакселом изучали на клеточной линии JURKAT WT, экспрессирующей Р-гр. Для оценки цитостатического действия препаратов использовали МТТ-тест, основанный на способности дегидрогеназ живых клеток превращать бледно-желтый МТТ в голубые кристаллы формазана.

Результаты и выводы. Процент включения паклитаксела составил 99,5 %, при этом размер наночастиц составил 300±100 нм. Для наносомальной лекарственной формы паклитаксела показано более плавное, контролируемое высвобождение по сравнению с обычным паклитакселом. Наносомальные частицы с паклитакселом оказывали цитотоксическую активность в низком диапазоне концентрации 10⁻⁶ М (жизнеспособность сохранили около 40 % клеток), в то время как обычный паклитаксел оказывал цитотоксический эффект в диапазоне концентрации 10⁻⁵–10⁻⁴ М (80% выживших клеток).

Таким образом, в ходе проведенного исследования показана возможность улучшения биодоступности и повышения цитотоксического эффекта в отношении клеток JURKAT WT, экспрессирующих Р-gp, посредством включения паклитаксела в наночастицы.

Н.А. Брусенцов¹, Ю.А. Пирогов², Т.Н. Брусенцова³,
П.И. Никитин³, М.П. Никитин³, Т.И. Ксенович³,
В.А. Полянский⁴, И.С. Голубева¹, М.В. Гуляев²,
Д.А. Тищенко², А.В. Иванов¹

ВЫЯВЛЕНИЕ СОСУДОВ, ПИТАЮЩИХ ОПУХОЛЬ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²НЦМТС МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

³ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

⁴НИИМ МГУ, Москва

Задача исследования. Внутривенное введение традиционных противоопухолевых препаратов (ТПП) лишь тормозит распространение злокачественных опухолей в организме больного. Чтобы помочь больному справиться с такими опухолями, успешно используются: направленная регионарная внутриартериальная доставка комбинаций ТПП с магнитоуправляемыми противоопухолевыми нанопрепаратами и регионарная гипертермия; хирургические методы и биотерапия с другими терапевтическими воздействиями. Основные усилия при этом направлены на оптимизацию способов раннего выявления сосудов, питающих опухоли.

Материалы и методы. Декстранферрит (ДФ) синтезировали из наночастиц Fe₃O₄ и декстрана. Золи ДФ в разных дозах были испытаны в качестве T₂ и T₂*-взвешенных негативных МРТ контрастных нанопрепаратов при визуализации: сосудов, питающих капсулу и опухоль, крови, направляющейся по сосудам к капсуле, текущей в капсуле и сосудах опухоли, таргетинга для подтверждения корректности доставки и распределения нанопрепаратов в опухоли при аденокарциноме молочной железы Ca 755 самок мышей C57Bl/6j с опухолями объемом от 40 до 420 мм³. В период от 3 ч до 30 ч до проведения МРТ сканирования внутривенно вводили от 0,02 мл до 0,2 мл 10% золя ДФ в полиглюкине. ДФ повышал контраст изображений органов и тканей, структур капсулы и сосудов, питающих опухоль.

Результаты. При внутривенном введении ДФ с дополнительной инъекцией магневиста и последующим T₂*, T₂*-взвешенным 3D сканированием получены усиленные МРТ-изображения, на основании которых определены расположение и функциональное состояние поверхностных и других сосудов, питающих капсулу и опухолевые ткани.

Выводы. Разработан способ выявления сосудов, питающих опухоль, в эксперименте.

Е.О. Букаева, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников,
Н.А. Плотникова

ХАРАКТЕРИСТИКА АНГИОГЕНЕЗА В ОПУХОЛЯХ ШЕЙКИ МАТКИ, ИНДУЦИРОВАННЫХ БЕНЗ(А)ПИРЕНОМ, – ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СКРИНИНГЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

ГОУВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Медицинский институт, кафедра патологии, Саранск
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Одним из наиболее важных достижений в лечении злокачественных новообразований в последние несколько лет является увеличение эффективности химиотерапии при ее использовании в комбинации с антиангиогенной терапией.

Такая комбинация может увеличивать продолжительность жизни больных колоректальным раком, раком легких, почек, и других не менее чем на 2–5 месяцев по сравнению с химиотерапией. Антиангиогенная терапия направлена на блокирование образования новых сосудов в опухоли и уничтожение уже существующих опухолевых сосудов. Ангиогенез – формирование новых микрососудов из уже существующих микрососудов. При блокировании данного процесса рост злокачественных опухолей в эксперименте прекращается и в опухоли наблюдается гибель опухолевых клеток из-за нехватки питательных веществ и кислорода. Одним из возможных механизмов, объясняющим повышение эффективности химиотерапии под действием антиангиогенных препаратов, является так называемая нормализация кровотока под действием антиангиогенной терапии.

Основной проблемой поиска эффективных антиангиогенных препаратов является тот факт, что используемые на сегодняшний день мышинные опухолевые модели *in vivo* не соответствуют клинической и морфологической модели опухолей человека. В нашем исследовании мы разработали опухолевую модель рака шейки матки, индуцированную бенз(а)пиреном и охарактеризовали их ангиогенную активность. Данная модель может быть использована для тестирования возможных ингибиторов опухолевого ангиогенеза.

Материалы и методы. Эксперимент был поставлен на 30 самках нелинейных белых мышей в возрасте 2 мес., весом 20–22 г. Моделирование цервикального канцерогенеза, индуцированного бенз(а)пиреном, производили по стандартной методике. Длительность эксперимента составила 26 недель. У мышей из каждой группы, подвергшихся воздействию бенз(а)пирена, и у всех интактных мышей была забрана ткань опухоли шейки матки для гистологического и иммуногистохимического исследований.

Патогистологическое исследование проводилось светооптическим методом. В ходе иммуногистохимического исследования была изучена экспрессия ангиогенных факторов в ткани индуцированных опухолей. Экспрессия VEGF и количество кровеносных сосудов, окрашенных антителами к CD31, изучалась с использованием коммерческих антител и проявочных тест-систем. Подсчитывали количество CD31+ микрососудов в опухоли в не менее 3 полях зрения при увеличении ×20. Экспрессию VEGF определяли в интенсивности окрашивания опухолевых клеток, как 1+ при низкой интенсивности окрашивания, и как 2+ при средней интенсивности окрашивания. Неоплазии классифицировались согласно рекомендациям Международного агентства по исследованию рака (МАИР).

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критериев t Стьюдента, точного метода Фишера ×2 с помощью пакета прикладных программ «МедСтатистика».

Результаты. Под влиянием бенз(а)пирена у мышей контрольной группы развивались опухоли шейки матки с частотой 90 % (27 животных из 30). Среднее число опухолей на 1 мышью-опухоленосителя в группе контроля составляло 3,4±0,4. При патогистологическом исследовании ткани опухолей шейки матки через 4 мес. от начала эксперимента у 20 мышей была выявлена дисплазия легкой степени. Морфологическая картина была представлена пролиферацией клеток базальных слоев эпителия, проникающих в промежуточный и поверхностный слой.

Через 5 мес. у 9 мышей был выявлен «рак на месте», характеризовавшийся появлением атипичных полиморфных опухолевых клеток, занимающих полностью всю толщу эпителиального пласта, но не выходящих за пределы базальной мембраны.

Через 6 мес. у 7 экспериментальных животных обнаружен плоскоклеточный рак с признаками инфильтративного роста тяжелой анаплазированной эпителии в подлежащие ткани. При ИГХ анализе процессов неоангиогенеза в индуцированных бенз(а)пиреном опухолях шейки матки у мышей наблюдалось более 15 CD31+ микрососудов в поле зрения, при этом в опухолевых клетках отмечалась ярко выраженная экспрессия VEGF(2+).

Выводы. Разработанная модель характеризуется усиленным ангиогенезом по сравнению с традиционно используемыми моделями перевиваемых опухолей и может быть использована для скрининга антиангиогенных веществ.

П.М. Бычковский¹, А.А. Кладиев², С.Ю. Щеголев³, Т.Л. Юркишова¹, Ф.Н. Капуцкий¹, С.О. Соломевич¹, С.А. Беляев¹, Ю.П. Истомин⁴, Е.Н. Александрова⁴, С.А. Красный⁴

КОЛЛОИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА КАК СРЕДСТВО НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРОСПИДИНА

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

²ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва

³ИБиФРиМ РАН, Саратов

⁴ГУ «РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова», Минск

Введение. Для увеличения терапевтического эффекта противоопухолевых препаратов необходимо разработать методы их целенаправленной доставки в пораженный орган. Перспективным представляется доставка лекарственных веществ с помощью биологически совместимых наночастиц. Так, инкапсулирование в «наноконтейнер» позволяет создавать инъекционные препараты пролонгированного действия, характерная особенность которых – накопление нанокапсул в районе опухоли, защищенность лекарственных форм от деструкции во время их переноса к пораженному органу, а также возможность активного или пассивного накопления в органе-мишени и высвобождение переносимых препаратов контролируемо как по дозе, так и по времени.

Материалы и методы. Водные растворы коллоидного золота (КЗ) со средним диаметром частиц 25 нм готовили по методике, описанной С.А. Маракушевым (1991). Изучена сорбция КЗ раствором гидрохлорида проспицина с концентрацией 0,1 г/мл. Исследование цитостатической активности проведено на монослойной культуре опухолевых клеток Hela (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, клон М), полученной из коллекции клеточных культур РНПЦ ЭМ. Культуру клеток выращивали в питательной среде 199 с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы и 50 мкг/мл канамицина.

Результаты и выводы. Установлено, что максимальное количество иммобилизованного проспицина составляет около 1 мг на 100 мкл раствора коллоидного золота. Показано, что цитостатическая активность проспицина, иммобилизованного на КЗ остается на том же уровне, что и для инъекционной формы проспицина, при значительном уменьшении количества цитостатика. Показано, что КЗ при больших концентрациях также способно проявлять цитостатическую активность.

С.Ю. Васильченко, А.В. Рябова, В.Б. Лоценов ПРИМЕНЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИЙ НАНОЧАСТИЦ В БИОТКАНЯХ IN VIVO

ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Задачи исследования. Разработка методов неинвазивной оценки концентрации наночастиц в биоло-

гических тканях *in vivo* с целью создания научного задела по диагностике и лечению злокачественных новообразований и ряда других заболеваний.

Материалы и методы. Исследование проведено на модельных растворах с оптическими свойствами, аналогичными свойствам биотканей, и на экспериментальных животных (мыши с привитой карциномой Эрлиха). Для характеристики коллоидных растворов наночастиц, приготовленных для системного введения экспериментальным животным, использовали спектрометр динамического рассеяния света Photocor Complex (определение гидродинамического радиуса наночастиц), спектрофотометр Hitachi U-3400 с интегрирующей сферой и волоконно-оптический спектрометр Lesa-01-Biospec с набором твердотельных лазеров для возбуждения флуоресценции (оптические свойства). Исследование биотканей экспериментальных животных, содержащих наночастицы, осуществлялось методами люминесценции спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения с применением волоконно-оптического спектрометра. Для оценки концентрации наночастиц в биотканях был разработан специальный алгоритм анализа получаемых спектральных данных.

Результаты и выводы. Показано, что оптико-спектральные методы могут эффективно использоваться для высокоточного неинвазивного количественного анализа накопления наночастиц в биотканях.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № П544).

С.Э. Гельперина¹, В.И. Швец² ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В МОЗГ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ

¹ООО «НПК «Наносистема», Москва

²Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

Задачи исследования. Изучение возможности применения биodeградируемых полимерных наночастиц (НЧ), модифицированных поверхностно-активными веществами (ПАВ), для доставки в мозг доксорубина (Докс); определение потенциала наносомальной формы доксорубина для лечения экспериментальной глиобластомы.

Материалы и методы. Полибутилдианоакрилатные наночастицы, нагруженные доксорубином (Докс-ПБЦА), получали методом полимеризации бутилдианоакрилата в водной среде. Противоопухолевую активность изучали на модели интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс Wistar. Параметры биораспределения и токсикологические характеристики Докс-ПБЦА изучали на крысах Wistar, используя стандартные методы. Сорбцию белков на поверхности НЧ изучали методом двухмерного электрофореза.

Результаты и выводы. Наносомальная форма доксорубина Докс-ПБЦА проявила противоопухолевый эффект в отношении глиобластомы при внутривенном введении. Увеличение продолжительности жизни составило 85 %; более того, Докс-ПБЦА обеспечивал длительную ремиссию (отсутствие опухоли, по крайней мере, в течение 6 мес.) у > 20 % животных. Как свидетельствуют результаты фармакокинетических исследований, противоопухолевый эффект Докс-ПБЦА в отношении интракраниальной опухоли обусловлен способностью наночастиц доставлять в мозг терапевтические концентрации доксорубина. Данные иммуногистохимического исследования показали, что Докс-ПБЦА оказывает выраженный антиангиогенный эффект, ингибируя рост сосудов в опухоли.

Результаты токсикологического исследования показали, что кардио- и тестикулярная токсичность доксорубина значительно ослабляется при связывании его с НЧ. Найденная корреляция между профилями сорбции белков плазмы на поверхности НЧ и фармакологическим эффектом наносомальных форм Докс предполагает, что доставка Докс в мозг происходит при участии апополипротеина А-I, который НЧ адсорбируют при введении в кровь.

Полученные результаты значительно расширяют наши представления о сфере применения НЧ как средства доставки лекарственных веществ в мозг, а также о практической ценности этой технологии. Можно полагать, что применение наносомальных препаратов открывает новые возможности для неинвазивной химиотерапии опухолей мозга.

К.С. Голохваст

НАНОЧАСТИЦЫ ПРИРОДНЫХ МИНЕРАЛОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СРЕДСТВА

Дальневосточный ГТУ

Задачи исследования. Ранее было показано (Pavelic et al., 2000-2002), что природные минералы (цеолиты) могут использоваться как перспективные противоопухолевые средства. Имеются также сообщения (Сидоренко и др., 2009), о том, что наночастицы металлов также подавляют рост опухолей.

Цель работы – исследовать возможность измельчения природных минералов до наноразмерной формы.

Материалы и методы. Природные минералы – цеолиты различных месторождений Дальнего Востока России предварительно измельчались в механической дробилке ВКМД-6 до миллиметровой фракции, а затем – в планетарной мельнице Fritch Pulverisette 2 в течение 10 мин. Более длительная обработка может привести к конформационным сдвигам в кристаллической решетке. С помощью лазерного анализатора частиц Fritch Analysette 22 NanoTec устанавливался размер частиц и их распределение по фракциям. Дополнительным методом исследования образцов являлась сканирующая электронная микроскопия с помощью JEOL JSM-6490LV.

Результаты и выводы. По результатам лазерного анализа размера частиц, разброс крупностей (частиц цеолита) невелик и составляет от 100 нм до 3 мкм, что в целом подтверждается и данными сканирующей электронной микроскопии. При этом частицы цеолита представлены достаточно окатанными обломками без острых углов.

Можно сделать предварительный вывод, что измельчение в планетарной мельнице в указанном режиме, может применяться как метод получения наноразмерных частиц цеолитов.

*Л.В. Гончаренко¹, Р.Б. Пугачева¹,
Н.К. Клаан², Э.И. Кукулина²*

ТИПЫ ПОЛИМЕРОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ (АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ, 2000-2010 ГГ.)

¹РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ВИНИТИ РАН, Москва

Липосомы, наноразмерные фосфолипидные образования из одной или нескольких бислойных амфифильных мембран, привлекли внимание медиков как потенциальные средства доставки лекарственных препаратов непосредственно в клетку еще с 60-х годов XX в. В настоящее время липосомальные лекформы успешно

применяются в терапии онкологических заболеваний, что позволяет повысить терапевтический эффект лекарственного средства (ЛС), снизить его токсичность (например, кардиотоксичность доксорубина) по сравнению со свободной формой, уменьшить побочные эффекты, предохранить ЛС от преждевременной деградации в организме.

Для увеличения длительности циркуляции ЛВ в кровотоке были разработаны т.н. стерически стабилизированные липосомы, гидрофильная оболочка которых дополнительно покрыта биосовместимым полимером, что снижает опсонизацию. Важно, чтобы ЛС надежно удерживалось внутри липосом до поступления в ткань или орган-мишень.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) стал первым полимером, примененным с этой целью, и пегилированные липосомы широко используются в настоящее время в клинической практике (препараты с доксорубином, цисплатином, паклитакселем и др.). Для получения стерически стабилизированных липосом, в частности, для модификации липосомальной оболочки используют также амфифильные производные ПЭГ, ПВП, акриламида.

Наряду с водорастворимыми полимерами и липосомами в водной среде в организм могут быть введены полимерные лекарственные формы субмикроскопического размера (10–1000 нм): наносферы (сферические сплошные полимерные частицы, в массу которых введено лекарственное вещество) и нанокapsулы (сферические полимерные оболочки включающие лекарственное вещество). Подобные полимерные системы образуются при полимеризации акриламида, метилметакрилата, эфиров цианакриловой кислоты или с использованием готовых полимеров – альбумина, циклодекстринов, полиэфиров молочной и гликолевой кислот.

Небольшой размер этих частиц позволяет создать на их основе устойчивые водные системы. Оптимальные пути применения введения таких лекарственных форм – инъекционное (в том числе внутривенное, подкожное и внутримышечное) и пероральное.

*Л.В. Гончаренко¹, Р.Б. Пугачева¹, С.А. Лысенко¹,
Е. Прохоров², М.И. Кумсков²*

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ОТКРЫТЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКАХ

¹РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ММФ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

По противоопухолевым веществам существует обширный материал, собранный и систематизированный в базы данных (БД) различных международных организаций: PubChem NCI (USA), Beilstein database, TOCRIS Bioscience, ChemBlink, DRUGBANK, PDB и т.п. дающий широкие возможности дальнейшего анализа для прогноза вида «структура-свойство» как для новых, так и ранее известных противоопухолевых соединений, в том числе в виде форм, обеспечивающих их направленную доставку (например, стерически стабилизированные липосомы, наносферы, нанокapsулы). Однако возможности использования этих БД ограничены доступными поисковыми сервисами одномерных запросов.

Одновременно неоднородность экспериментальных показателей, недетерминированность пространственных молекулярных структур, возможность неадекватного представления результатов, а также то, что процесс выборки данных для создания обучающих массивов остается достаточно трудоемким, все это влияет на адекватность анализа и прогнозирования свойств.

Одна из задач, позволяющих автоматизировать в дальнейшем процесс формирования обучающих массивов для программ прогноза структура-свойство, (таких как PASS и ряд других на основе QSAR-методов) состоит в поиске и выделении пространственных дескрипторов молекулярных структур для осуществления прогноза биологической активности и, в совокупности с ними, токсикологических свойств. Был рассмотрен метод нечетких дескрипторов для представления пространственных структур и прогнозирующая модель, отличающаяся количественной оценкой биологических свойств.

И.Н. Григорьева, Э.Ш. Соломко,
Е.В. Степанова, Т.К. Харатишвили

**ИНГИБИРОВАНИЕ
ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ –
НОВЫЙ ПОДХОД
К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПРЕПАРАТОВ
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**

Введение. В настоящее время показано, что ангиогенез является не единственным механизмом снабжения опухолевых клеток питательными веществами и кислородом. Васкулогенная мимикрия (ВМ) – это формирование *de novo* опухолевыми клетками каналов, участвующих в кровотоке и окруженных базальной мембраной, в отсутствие эндотелиальных клеток и фибробластов. Накапливаются данные, что процесс ВМ может быть задействован в формировании резистентности к традиционной антиангиогенной терапии. Перспективным является подход к тестированию нанопрепаратов, направленных на снижение кровотока в опухоли, когда анализируется их эффективность блокирования ангиогенеза и васкулогенной мимикрии.

Цель – разработать скрининговую экспериментальную опухолевую модель для тестирования способности нанопрепаратов ингибировать ВМ в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Исследование проведено на 17 клеточных линий метастатической меланомы кожи человека. Тестирование клеточных линий на способность к васкулогенной мимикрии *in vitro* проводилось при инкубации клеток на Матригеле, фибронектине и коллагене. Эксперименты *in vivo* проведены на иммунодефицитных мышках линии BalbC при введении подкожно $1-5 \times 10^6$ клеток метастатической меланомы кожи. Анализ ВМ на срезах опухолей проводился с использованием реактива Шиффа (PAS окрашивание) и иммуногистохимического анализа экспрессии CD31 на эндотелиальных клетках.

Результаты. Среди 17 клеточных линий метастатической меланомы кожи была отобрана клеточная линия mel Cher в качестве положительной модели ВМ. Клеточная линия метастатической меланомы кожи Mel Cher стабильно воспроизводит СПС *in vitro* при инкубации на матриксе базальных мембран (Матригель) в краткосрочных тестах. СПС формируются в течение 8 ч после нанесения клеток и сохраняются до 24 ч. Образованные структуры имеют вид упорядоченной сети, где клетки образуют соединенные между собой трубочки, повторяя поведение эндотелиальных клеток. Инкубация клеток линии Mel Cher с противоопухолевыми веществами в разработанном краткосрочном тесте *in vitro* позволяет выявить вещества, блокирующие образование ВМ. В этом случае клетки, посаженные на Матригель, формируют либо короткие, незамкнутые трубочки, неограниченные контактами с другими трубочками, либо собираются в отдельные, не связанные

друг с другом кластеры клеток. Также клеточная линия меланомы кожи Mel Cher способна к формированию тубулярных структур в долгосрочных тестах (до 3 недель). Клетки инкубируются на матриксе базальных мембран (Матригель) или белках экстрацеллюлярного матрикса (коллаген, фибронектин) в высокой плотности в течение 3 недель. Формирование тубулярных структур начинается спустя три дня после посадки клеток и завершается к концу 3 недели.

Проведен анализ экспрессии некоторых белков на клетках линии Mel Cher иммуноцитохимическим методом. Показано, что данная линия экспрессирует маркеры эндотелиальных клеток, что позволяет использовать ее для изучения механизмов ВМ.

Показано, что при имплантации мышам 1–5 млн. клеток Mel Cher наблюдается формирование опухолей в течение 20 дней. При гистологическом исследовании срезов с парафиновых блоков удаленной опухоли показано, что в опухоли образуются PAS-положительные структуры (параллельные, параллельные с пересечением, арки и т.д.), характерные для опухолей человека. Окрашивание реактивом Шиффа (PAS окрашивание) позволяет выделить базальные мембраны в ткани опухоли, характерные для кровеносных сосудов и каналов, ограниченных опухолевыми клетками (ВМ). Дополнительное двойное окрашивание антителами против CD34+ показало, что PAS-положительные структуры не ограничиваются только CD34-положительными кровеносными сосудами, что также свидетельствует о наличии ВМ внутри имплантированных опухолей.

Выводы. Таким образом, разработана скрининговая модель для изучения веществ, блокирующих ВМ. Опухолевая модель запатентована.

А.М. Дёмин¹, О.В. Корякова¹, М.А. Уймин²,
А.А. Мысик², А.Е. Ермаков², В.П. Краснов¹
**МОДИФИКАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ Fe_3O_4
ПРОИЗВОДНЫМИ
ПРОПИЛТРИАЛКОКСИ СИЛАНОВ**

¹Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

e-mail: demin@ios.uran.ru

²Институт физики металлов УрО РАН, Екатеринбург
e-mail: yermakov@imp.uran.ru

Задачи исследования. Наработка методов химической модификации поверхности НЧ Fe_3O_4 функционализированными производными пропилсилана (3-амино-, 3-глицидокси- и 3-меркаптопропилтриоксисиланом), изучение влияния на процесс функционализации природы растворителей, а также разработка методов количественной оценки степени иммобилизации силана на поверхности НЧ.

Материалы и методы. НЧ Fe_3O_4 (20–40 нм) получены методом газофазного синтеза в ИФМ УрО РАН. Иммобилизация производных пропилсилана на МНЧ подтверждена данными ИК-спектроскопии при использовании инфракрасного Фурье-спектрометра «Nicolet 6700». Массовая доля S_i определялась методом атомно-эмиссионной спектроскопии на оптическом эмиссионном спектрометре (АЭС) «iCAP6300 Duo» с индуктивно связанной плазмой.

Результаты и выводы. В ходе работ разработаны методы поверхностной модификации НЧ Fe_3O_4 производными пропилсилана, получены образцы, содержащие на поверхности 0,6–0,9 ммоль силанового производного на 1 г НЧ. Реакция силианизации наиболее эффективно протекает в полярных растворителях (95 % C_2H_5OH или H_2O). Максимальная степень модификации поверхности наночастиц во всех случаях достигается при использовании 2,0–3,0 ммоль алкоксисилана в расчёте на 1 г МНЧ.

Разработана методика измерений количества аминопропилсилана на поверхности НЧ Fe_3O_4 методом ИК спектроскопии, основанная на сопоставлении отношений S полос колебаний связей $\text{Fe}-\text{O}$ ($750\text{--}486\text{ см}^{-1}$) наноматериала и связей $\text{Si}-\text{O}$ ($1240\text{--}786\text{ см}^{-1}$) материала покрытия с результатами измерения массовой доли Si в исследуемом нанокompозите методом АЭС.

Работа выполнена при финансовой поддержке УрО РАН (проект № 09-П-3-2001 и № 09-П-3-2004), а также в рамках Государственной программы поддержки ведущих научных школ (грант НШ 65261.2010.3), и грантом РФФИ Урал №10-03-96003-р_урал_a.

А.С. Дудниченко¹, Ю.М. Краснополянский²

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ЦИТОСТАТИКОВ В ОНКОЛОГИИ

¹Харьковская МАПО, Украина

²Кафедра технологии НТУ «ХПИ», Харьков

Использование таргетной терапии в лечении 30 сегодня является стандартом, поэтому разработка и использование нанотехнологий, в частности, липосом, является перспективным. На клинической базе кафедры онкологии (областной онкологический центр) при проведении ХТ использованы липосомальный доксорубин (Липодокс) и липосомальный цисплатин (Липоплат). При метастатическом раке желудка (IV стадия, 37 больных, 1996 г.) получено увеличение медианы выживаемости с 4,9 мес. до 6,1 мес. ($p < 0,05$) по сравнению с химиотерапией стандартным доксорубином и цисплатином. При метастатическом колоректальном раке (24 больных) медиана выживаемости возросла соответственно с 5,9 мес. до 8,3 мес. Липодокс также использовали в качестве неoadъювантной (предоперационной) монокимиотерапии у 64 больных (2006 г.) местнораспространенным (неоперабельным) РМЖ. Операцию удалось выполнить в 41 % случаев в основной и в 38 % случаев в контрольной группе после ХТ стандартным доксорубином. Сократился срок подготовки к операции (перевод неоперабельной опухоли в операбельную) с 84 дней в контрольной группе до 42 дней в основной группе. Уменьшилась токсичность ХТ в основной группе. При распространенном неоперабельном РЛ (средний возраст 65,5 лет) программу ХТ (цисплатин и этопозид, 6 курсов в течение 18 недель) удалось выполнить у 21 из 35 больных (60 %) при использовании липосомального цисплатина, в контрольной группе без липосом – только в 40 % случаев (2009–2010 гг.); остальным больным ХТ остановлена ввиду токсичности (снижение клиренса креатинина). Наш клинический опыт позволяет рекомендовать использование липосомальных цитостатиков как «таргетных», а также более доступных по сравнению с моноклональными антителами.

К.В. Ермакова¹, З.С. Смирнова¹, И.Ю. Кубасова¹, Л.М. Борисова¹, М.П. Киселева¹, Н.А. Оборотова¹, Г.А. Меерович³, Е.А. Лукьянец²

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ДИСПЕРСИИ ТИОСЕНСА И ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ (ТИОСЕНСА-ЛИО) ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ 101/8 КРЫС

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАН, Москва

²ФГУП «ГНЦ» НИОПИК, Москва

³ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Лечение злокачественных опухолей головного мозга составляет одну из нерешенных задач в нейроонкологии.

На современном этапе наиболее эффективным является комбинированный подход. Фотодинамическая терапия (ФДТ) является эффективным дополнительным методом, применяемым при комбинированном лечении злокачественных глиом. Одним из важных направлений повышения эффективности фотодинамической терапии является поиск фотосенсибилизаторов (ФС) с поглощением в спектральном диапазоне 700–800 нм, в котором собственное поглощение биологических тканей минимально. Одним из таких ФС является новый отечественный фотосенсибилизатор Тиосенс.

Целью настоящего исследования является сравнение эффективности ФДТ с использованием липосомальной дисперсии Тиосенса и лиофилизированной липосомальной лекарственной формы (Тиосенса-ЛИО) на глиобластоме 101/8 крыс.

Материалы и методы. Глиобластоме 101/8 перивалили интракраниально беспородным крысам по 1–2 млн. опухолевых клеток. Липосомальную дисперсию Тиосенса и Тиосенса-ЛИО вводили внутривенно в дозе 3 мг/кг через 6 дней после перевивки опухоли и за 24 ч до проведения лазерного облучения. Уровень накопления фотосенсибилизатора оценивали спектрально-флуоресцентным методом. Лазерное облучение проводили при плотности мощности 100 мВт/см² в течение 15 мин (90 Дж/см²). Критерием эффективности служило увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) опытных крыс по сравнению с контрольными животными.

Результаты. Установлено, что липосомальная дисперсия Тиосенса и Тиосенса-ЛИО проникают через гематоэнцефалический барьер и селективно накапливаются в глиобластоме 101/8. Терапевтическая эффективность ФДТ с использованием липосомальной дисперсии Тиосенса при интерстициальном лазерном облучении через трепанационное отверстие составляет 22 % УПЖ, а Тиосенса-ЛИО – 18 %. При дополнительной декомпрессионной краниотомии (4×5 мм) и интерстициальном лазерном облучении УПЖ составляет 70 % и 80 % для липосомальной дисперсии Тиосенса и Тиосенса-ЛИО соответственно.

Заключение. Леофилизированная липосомальная лекарственная форма Тиосенса не уступает по эффективности липосомальной дисперсии Тиосенса.

К.Ю. Жижин, Е.Ю. Матвеев, И.Г. Макаренко,

Я.З. Волошин, Н.Т. Кузнецов

НОВЫЕ МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ БОРСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ БОРА В КЛЕТКИ ОПУХОЛЕЙ

Институт общей и неорганической химии им.

Н.С. Курнакова РАН, Москва

Трис-диоксиматные комплексы с инкапсулированным в трехмерной полости клатрохелатного лиганда ионом металла являются удобной синтетической «платформой» для получения новых борсодержащих соединений для ¹⁰В-нейтронозахватной терапии. Молекулы клатрохелатов имеют четыре оси и восемь точек функционализации, для которой можно использовать широкий круг функционализирующих заместителей. Это позволяет получать трехмерные молекулярные структуры с заданным расположением фармакофорных заместителей, то есть использовать макробициклические остовы в качестве трехмерного корда для дизайна наноразмерных борсодержащих биологически активных соединений.

В докладе будут представлены предложенные нами основные подходы к созданию соединений на основе трис-диоксиматов для ¹⁰В-нейтронозахватной терапии рака.

Будут изложены методы химического конструирования гибридных структур, включающих клеточные комплексы металлов, функционализированные полиэдрическими кластерами бора. Разработанные нами подходы позволяют использовать в качестве борсодержащих соединений для направленной модификации клеточных комплексов металлов производные кластерных анионов бора с тиольными, аминными, нитрилевыми группами. При этом удастся синтезировать олигомерные клатрохелат-клозо-декабораты, содержащие в своем составе более 60 атомов бора.

Таким образом, нами разработан новый подход к синтезу препаратов для НЗТ рака, причем эффективность соединений обеспечивается двумя основными факторами: с одной стороны, значительным содержанием атомов бора, как в клеточном остове, так и в реберных клозо-боратных заместителях, а, с другой стороны, адресной доставкой соединений в мишени – опухолевые клетки организма.

С.Д. Захаров¹, А.В. Иванов², Nguyen Hung Son³

О РОЛИ ВОДЫ В МОДИФИКАЦИИ МЕМБРАННОЙ НАНОТОПОЛОГИИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ ПЕРЕРОЖДЕНИИ КЛЕТОК

¹Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

³Институт физики Национальной академии наук Вьетнама

Задачи исследования. Потенциал применения достижений физических наук в диагностике и терапии онкологических заболеваний велик.

Особенно перспективны разработки на базе так называемых холодных лазеров, обладающих выраженными биологическими эффектами в отсутствии заметного теплового нагрева. В основе действия холодных лазеров лежит светокислородный эффект (СКЭ). Механизм СКЭ на молекулярном уровне описывается в квантовомеханических терминах магнитно-спиновой конверсии растворенного кислорода.

В докладе будет продемонстрирована роль динамических изменений водной матрицы в поддержании нормальной наноархитектуры клеточных мембран и их злокачественной модификации.

Материалы и методы. Для исследований специально разработаны экспериментальные методы невозмущающей диагностики.

В качестве объектов воздействия использованы клеточные культуры карциносаркомы Льюиса с концентрацией около 10^7 см⁻³ в забуференном изотоническом растворе NaCl, pH = 7,4. Изучение квантово-молекулярных механизмов производилось на модельных объектах (эритроциты человека, дрожжевые клетки, растворы альбуминов).

Результаты. Акты триплет-синглетной конверсии молекулярного кислорода, происходящие вследствие фотопоглощения, по-видимому, сопряжены с пара-орто конверсией ядерных спин-изомеров воды преимущественно во внеклеточной среде. Возмущения, в форме спиновых волн, распространяются по водородным связям водной среды и взаимодействуют с белковой периферией клеточных мембран, индуцируя конформационные переходы.

Выводы. Водная матрица играет интегрирующую роль в поддержании стабильности клеточной наноархитектуры.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 10-02-90301-Вьет_а.

Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева,
И.В. Ярцева, Л.Г. Гатинская

ОЦЕНКА ТОЧНОСТИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКАСЕНСА В НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Октасенс – новый липофильный фотосенсибилизатор, предназначенный для фотодинамической терапии злокачественных опухолей. Для использования октасенса в качестве лекарственного средства в лаборатории разработки лекарственных форм РОНЦ была создана лиофилизированная наноструктурированная модель лекарственной формы (ЛНЛФ-лио).

Цель работы – оценка точности методики количественного определения октасенса в предложенной модели лекарственной формы.

Материалы и методы. Образцы ЛНЛФ-лио; УФ-спектроскопия.

Результаты и выводы. Количественное определение октасенса проводили спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность растворов в наиболее интенсивном максимуме поглощения $\lambda_{\max}$ 728±2 нм. В качестве растворителя была использована смесь хлороформ-пиридин (1000:1). На первом этапе было проведено определение основного действующего вещества для одной серии ЛНЛФ из 6 флаконов порознь. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора рабочего стандартного образца (РСО) октасенса. Относительная погрешности определения $\epsilon_{\text{отн}}$ при этом составила 0,86 %. Она включает в себя не только ошибку самого определения, но и ошибку, связанную с дозированием при наработке лекарственной формы.

Для нивелирования ошибки дозирования проведено 8 параллельных определений октасенса в усредненной пробе, полученной смешением содержимого 4 флаконов лекарственной формы. Относительная погрешность определения в объединенной пробе составила 0,28 %. Численное значение коэффициента нормированных отклонений (коэффициента Стьюдента), рассчитанное по результатам анализа обоих выборок составило $t = 0,67$ и $1,76$ соответственно. Табличное значение коэффициента Стьюдента при 95%-ной доверительной вероятности и степени свободы $f = 5$ равно 2,57; $f = 7$ равно 2,26, т.е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (95 %). Таким образом показано, что полученные результаты, являются правильными, предложенная методика количественного определения октасенса в лиофилизированной наноструктурированной лекарственной форме неотягощена систематическими ошибками и обладает достаточной точностью.

Работа поддержана Правительством г. Москвы

О.А. Иноземцева, Г.С. Терентюк,
Б.Н. Хлебцов, Н.Г. Хлебцов

НАНОКОМПОЗИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В СОСТАВЕ ОБОЛОЧКИ, ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Саратовский государственный университет им
Н.Г. Чернышевского, Саратов

В настоящее время большое число научных и технических исследований посвящено проблеме капсуляции различных веществ с использованием микро- и наноразмерных контейнеров. Следует отметить, что решение указанной проблемы тесно связано с решением задач контролируемой доставки и высвобождения капсулируемого материала.

Одним из подходов, позволяющих реализовать указанные задачи, является метод, основанный на последовательной адсорбции противоположно заряженных полиионных макромолекул на поверхность сферических микрочастиц. Результатом применения данного метода является формирование на поверхности микрочастицы полиэлектролитной оболочки, имеющей определенную толщину и состав, с управляемой проницаемостью, биосовместимостью и биodeградируемостью. Проницаемость оболочки микроконтейнера, а также процесс высвобождения инкапсулированного материала зависят от толщины и состава оболочки и могут регулироваться путем изменения pH, ионной силы, температуры и других физико-химических параметров микроокружения. Подобные полиэлектролитные микрокапсулы могут быть использованы в качестве носителей биологических веществ для контролируемой доставки и высвобождения капсулированного материала для биомедицинских целей.

Однако для многих областей применения необходимо удаленно контролировать проницаемость оболочки микрокапсул. Существенный прогресс был достигнут в применении лазерного излучения для удаленного вскрытия микрокапсул. Оптическое излучение может быть использовано для терапевтических и диагностических целей благодаря избирательному взаимодействию с оболочками микроконтейнеров. В настоящее время в качестве компонентов оболочки микроконтейнера с целью придания ей чувствительности к лазерному излучению используют различные красители или металлические наночастицы на основе благородных металлов (Au, Ag). Было установлено, что золотые наночастицы, находящиеся в оболочке микрокапсулы, взаимодействуют с лазерным излучением. Это взаимодействие приводит к изменению проницаемости оболочки или к ее разрушению. Кроме того, было установлено, что чувствительность микрокапсул, содержащих в составе оболочки наночастицы золота, зависит от степени агрегации этих наночастиц и характера их распределения в оболочке. Авторами была показана возможность создания биосовместимых микрокапсул, чувствительных одновременно к лазерному излучению и магнитному полю.

Одним из недостатков использования лазерного излучения применительно к вскрытию микрокапсул, является локальность воздействия, что позволяет вскрывать только единичные капсулы. Для практического применения необходимо увеличивать площадь облучения, что приведет к уменьшению эффективности вскрытия микрокапсул. Повысить чувствительность микрокапсул к лазерному излучению возможно путем включения в оболочку нанообъектов, пик плазмонного резонанса которых, наиболее близок к длине волны лазерного излучения. В качестве таких нанообъектов с возможностью настраивания плазмонного резонанса для формирования биосовместимых нанокомпозитных микрокапсул были использованы золотые наностержни и наноклетки.

З.Г. Кадагидзе
**МИНОРНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ
 Т-ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ
 ПРИ ВАКЦИНОТЕРАПИИ
 ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**
РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН, Москва

В настоящее время разработаны различные методы иммунотерапии, направленные на повышение эффективности специфического противоопухолевого иммунного ответа, однако, в подавляющем большинстве случаев результаты иммунотерапевтических методов,

как правило, очень скромные. В последнее время в оценке противоопухолевого иммунитета большое внимание уделяется минорным популяциям Т-лимфоцитов, обладающим супрессорными функциями: регуляторным CD4⁺CD25⁺ (Трег), ЕКТ (естественные Т-киллеры) клеткам, миелоидным супрессорным клеткам и опухолеассоциированным макрофагам (M2). К настоящему времени наиболее изученными являются первые две популяции клеток. Установлено, что при злокачественных опухолях ЕКТ-клетки участвуют не только в защите от опухолевого роста, как предполагалось ранее, но и в подавлении противоопухолевого иммунного ответа. Это парадоксальное поведение связывают с существованием разных субпопуляций ЕКТ-клеток. Экспериментальные исследования показали, что ЕКТ-клетки I типа, как правило, стимулируют противоопухолевый иммунный ответ, а ЕКТ II типа проявляют супрессорную активность. В наших исследованиях при вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом, установлено: исходно высокое содержание ЕКТ является плохим прогностическим признаком эффективности лечения; увеличение этой популяции клеток в процессе терапии может указывать на прогрессирование основного заболевания.

Исследования последних лет показали, что популяция регуляторных Т-клеток – Трег (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺) играет решающую роль в обеспечении иммунологической аутоотолерантности и негативном контроле как патологических, так и физиологических иммунных реакций. Повышение количества Трег коррелирует с прогрессированием заболевания и, как полагают, является одной из причин низкой эффективности иммунотерапии онкологических больных. В то же время количество Трег увеличивается у больных, получавших вакцино- или цитокинотерапию, что, по-видимому, играет важную роль в снижении эффективности этих методов лечения.

Очевидно, что эффективная иммунотерапия злокачественных новообразований должна сочетать методы, повышающие специфический противоопухолевый иммунный ответ, с одновременным подавлением активности супрессорного звена иммунитета.

А.П. Каплун, В.И. Швец
**ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛАВНЫХ ТИПОВ
 НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ
 МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**
МГА ТХЧТ им. М.В. Ломоносова

Партикулярные средства доставки лекарственных субстанций – особая лекарственная форма, которая позволяет существенным образом изменить фармакокинетику субстанции. Размер частиц в большинстве случаев имеет определяющее значение.

Наиболее широко известный эффект наночастиц – пассивное нацеливание в области с увеличенными порами в капиллярах (раковые опухоли и другие сайты воспаления). Нано- и микрочастицы эффективно поглощаются макрофагами, и поэтому они могут быть использованы как иммунологические адъюванты.

Это же свойство эксплуатируется и при конструировании лекарственных препаратов, направленных на уничтожение внутриклеточных патогенов. Причем и в этих случаях размер имеет значение.

Местное использование препаратов на основе наночастиц позволяет значительно снизить побочные эффекты за счет слабого проникновения в системный кровоток. Защита субстанции от преждевременной дегградации – еще одно важное свойство партикулярных средств доставки.

Это относительно новое направление имеет все шансы в скором времени стать одним из главных направлений разработки лекарственных форм. Преодоление физиологических барьеров, таких как гематоэнцефалический, эпителий кишечника – требует специальных свойств поверхности в первом случае, и стабильности к гидролазам – во втором. Другие немаловажные свойства партикулярных средств доставки: наночастицы понижают токсичность загруженных субстанций, депонирование и, следовательно, увеличение времени действия, солюбилизация плохо растворимых веществ, что приводит к увеличению биодоступности.

В настоящее время на фармацевтическом рынке присутствуют: около 15 липосомных препаратов, 3 мультивезикулярных препарата, около 20 жировых эмульсий, 5 наносуспензий, по одному: наноленты, нанодиски, мицеллы. На разных стадиях клинических исследований находятся еще столько же. С другой стороны исследуется не менее 20 типов нано- и микрочастиц, и все они имеют свои достоинства и недостатки, среди которых необходимо учитывать и экономические параметры. Таким образом, весьма актуальными становятся методы выявления наиболее удобного типа препаратов для данной конкретной субстанции, для данного способа введения. В докладе обсуждается один из способов решения данной проблемы.

Д.И. Князев, Д.В. Новиков, Е.Ю. Конторщикова, А.А. Бабаев, К.А. Коровушкина, А.Ю. Барышников, В.В. Новиков

ЭКСПРЕССИЯ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ICAM-1 ПРИ ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

*НИИ молекулярной биологии и региональной экологии ННГУ им. Н.И.Лобачевского, Нижний Новгород
Нижегородская государственная медицинская академия
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

Задачи исследования. ICAM-1 – мембранный гликопротеин, основная роль которого состоит в формировании адгезивных контактов, а также в осуществлении межклеточной сигнализации. Экспрессия ICAM-1 на опухолевых клетках может вести как к усилению, так и к угнетению опухолевых процессов. Показана экспрессия ICAM-1 клетками опухолей толстого кишечника, молочной железы, меланомы. Известен однонуклеотидный полиморфизм (SNP rs5498), проявляющийся в вариации нуклеотидов аденин-гуанин и приводящий к аминокислотной замене лизин-глутамин в составе трансмембранного домена ICAM-1. Ассоциация этого полиморфизма с онкозаболеваниями является предметом изучения. Задачей настоящего исследования явился анализ экспрессии гена ICAM-1 и полиморфизма rs5498 в клетках опухолевых очагов больных миомой и аденокарциномой тела матки.

Материалы и методы. В исследование были включены 32 больных миомой и 16 больных аденокарциномой тела матки в возрасте от 30 до 79 лет. Детекцию мРНК мембранной и растворимой форм ICAM-1 в образцах опухолей проводили методом ОТ-ПЦР. Генотипирование по SNP rs5498 выполняли методами ПЦР и секвенирования фрагмента нуклеотидной последовательности гена ICAM-1. Определение уровня растворимого ICAM-1 в сыворотке крови выполняли иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител ИКО-184, специфичных к ICAM-1, и поликлональных антител, специфичных к мембранным антигенам мононуклеарных клеток крови человека.

Результаты и выводы. При миоме матки мРНК мембранной формы ICAM-1 обнаруживалась в 15,6 % случа-

ев, мРНК растворимой формы – в 6,3 % случаев. По сравнению с миомой частота встречаемости мРНК мембранной формы ICAM-1 при аденокарциноме была выше – 25 %, тогда как встречаемость мРНК растворимой формы была той же. Необходимо отметить, что мРНК растворимой формы ICAM-1 наблюдалась только в образцах с присутствующей мРНК мембранной формы.

Уровень растворимого ICAM-1 в сыворотке крови больных миомой и аденокарциномой тела матки в среднем составил 260 ± 72 и 117 ± 76 U/ml и превышал норму (72 ± 10 U/ml) в 3,6 и в 1,6 раза, соответственно. При наличии мРНК мембранной формы ICAM-1 в опухолевых очагах больных миомой средний уровень sICAM-1 был в 5,7 раза выше (907 ± 264 U/ml), чем у больных, отрицательных по данной форме мРНК в опухолевом очаге. При аденокарциноме наличие мРНК мембранной формы ICAM-1 было ассоциировано с пониженным сывороточным уровнем sICAM-1 (40 ± 15 U/ml), а отсутствие – с повышенным в 2 раза уровнем (143 ± 102 U/ml). То есть, при миоме матки повышенный сывороточный уровень молекул sICAM-1 может быть обусловлен шеддингом с поверхности опухолевых клеток.

Распределение генотипов по SNP rs5498 при миоме матки было следующим: AA – 28,1 %; AG – 59,4 %; GG – 12,5 %. При аденокарциноме доля генотипа AA составила 25 %, генотипов AG и GG – 56 и 19 %. При сравнении с данными распределения генотипов у здоровых представителей европейской популяции (AA – 29 %, AG – 49 %, GG – 22 %) можно отметить тенденцию к снижению частоты генотипа GG при миоме, а также к снижению частоты генотипа AA при аденокарциноме тела матки.

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

Е.Ю. Колдаева, Е.Ю. Григорьева, Ю.В. Стукалов СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ НАНОКОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ РАДИОТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Соединение, связывающее туморотропное вещество с терапевтическим агентом, например, радионуклидом, должно быть не токсично в дозах, используемых для противоопухолевой терапии. Основными параметрами токсикометрии являются: порог острого действия (Lim ac), максимально переносимая (МПД), средне смертельная (LD50) и абсолютно смертельная (LD100) дозы. Токсичность также характеризуют возникающие побочные эффекты и средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных при введении вещества в различных дозах.

Материалы и методы. В эксперименте использовали мышей Balb/c. Соединения вводили интраперитонеально, однократно в 0,2 мл 10% ДМСО в физиологическом растворе в дозах: полигидроксиаминоен_06 (I) 62,5 мг/кг; 125 мг/кг; 187,5 мг/кг; 250 мг/кг; 375 мг/кг; 500 мг/кг; 750 мг/кг; 1000 мг/кг; полигидроксиаминоен_07 (II) 62,5; 125; 187,5; 250; 375; 500; 750; 1000; 1250; 1500; гидроксильированный полигидроксиаминоен (III) 100; 250; 400; 550; 700; 850; 1000; 1200. Указанные дендримеры отличаются химическим строением исходных дендронов. Наблюдение за животными осуществляли в течение одного месяца. У павших мышей макроскопически оценивали изменения внутренних органов. Определяли значения Lim ac, МПД, LD100 и по методу Кербера рассчитывали LD50. Рассчитывали зону LD50/ Lim ac и СПЖ при разных дозах.

Результаты и выводы. В результате проведенных исследований были определены следующие параметры токсикометрии исследуемых соединений: соединение I – МПД = 250 мг/кг, LD100 = 1000 мг/кг, LD50 = 500 мг/кг, LD50/Lim ac = 2,00, СПЖ при LD50 = 72±15,6 ч; соединение II – МПД = 375 мг/кг, LD100 = 1500 мг/кг, LD50 = 771 мг/кг, LD50/Lim ac = 2,05, СПЖ при LD50 = 96±14,4 ч; соединение III – МПД = 550 мг/кг, LD100 = 1200 мг/кг, LD50 = 804 мг/кг, LD50/Lim ac = 1,46, СПЖ при LD50 = 72±14,5 ч.

Введение в сублетальных дозах не вызывало видимых нарушений в состоянии и поведении животных. Введение доз выше МПД вызывало в течение первых 30 мин наступление сопорозного состояния без признаков атаксии или местных парезов. При введении летальных доз смерть наступала в течение 0,5–1 ч – 144 ч, в зависимости от дозы. На вскрытии: сердце, почки, селезенка и легкие макроскопически без выраженной патологии, печень гиперемирована, желчный пузырь увеличен в объеме.

Тонкий кишечник содержал кровь. На основании вышеизложенного можно говорить о гепато-, энтеро- и нейротоксичности соединения в высоких дозах. У выживших животных отмечали транзиторную потерю 5–10 % массы тела в течение первых 5 дней после введения испытуемого вещества. Признаков хронической интоксикации не наблюдали.

Изученные дендримеры могут быть использованы в создании лекарственных средств для таргетной терапии опухолей, поскольку их концентрации, вводимые в организм, намного меньше порога острого токсического действия и максимально переносимой дозы, а побочных эффектов в данных дозах не наблюдается.

Е.А. Котова, Н.А. Оборотова, Е.В. Игнатьева
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИФЕЛИНА
В РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ
 РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цифелин – оригинальный отечественный препарат алкилирующего действия. Цифелин проявляет противоопухолевую активность при таких заболеваниях, как миеломная болезнь, саркома Юинга, семинома яичка, рак яичников.

Преимуществом данного препарата является отсутствие выраженного гемодепрессивного эффекта как у других цитостатиков. Учитывая этот факт, актуальной является разработка и совершенствование методики количественного определения цифелина в различных лекарственных формах.

Задачи исследования. Разработать методику количественного определения цифелина в изготовленных лекарственных формах. Определить диапазон концентраций, при которых наблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации вещества.

Материалы и методы. Цифелин – производное хлорэтиламина, белый или белый с кремовым оттенком кристаллический порошок; практически нерастворим в воде и эфире, растворим в различных органических растворителях. Определение спектра поглощения проводили на спектрофотометре СФ-46.

Результаты и выводы. При разработке методики определения количественного содержания цифелина в готовой лекарственной форме особое внимание было уделено изучению поведения вспомогательных веществ в растворах для спектрофотометрического определения.

Изучили способность вспомогательных веществ поглощать излучение в области 200–400 нм и таким образом мешать определению основного действующего вещества. Исследования показали, что вспомо-

гательные ингредиенты в концентрациях, аналогичных составу лекарственной формы, не изменяют спектральных характеристик (положения и интенсивности максимумов) цифелина.

Для растворения цифелина и вспомогательных веществ при спектрофотометрическом определении в УФ-области выбран этиловый спирт 95%, в котором цифелин и все компоненты лекарственной формы хорошо растворяются.

При измерении спектров поглощения определены два максимума: 260 и 301 нм с различной интенсивностью пиков на кривой. Исследуемые растворы подчиняются закону Бугера – Ламберта – Бера в диапазоне концентраций цифелина от 2 мг/мл до 40 мг/мл.

*В.П. Краснов¹, Н.А. Оборотова², А.А. Тумашов¹,
 З.С. Шпрах², Г.Л. Левит¹, К.В. Костин²,
 А.Ю. Барышников²*

АНАЛИЗ
ИЗОМЕРНОГО СОСТАВА ЛИЗОМУСТИНА
В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

¹Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН, Екатеринбург

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Целью работы являлась разработка метода определения содержания изомеров: 9-(2-хлорэтил)-7-нитрозо-L-гомоцитруллина (1) и 9-(2-хлорэтил)-9-нитрозо-L-гомоцитруллина (2) в липосомальной лекарственной форме препарата лизомустин методом ВЭЖХ.

Материалы и методы. Липосомальная лекарственная форма лизомустина получена в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДИТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Химически чистые образцы изомеров 1 и 2 синтезированы в ИОС УрО РАН.

Результаты и выводы. Показано, что метод определения изомерного состава лизомустина, используемый для анализа субстанции и лиофилизованной лекарственной формы препарата (ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте), не обеспечивает достаточной точности анализа, вследствие мешающего влияния компонентов липосом.

Определение изомерного состава в липосомальной лекарственной формы лизомустина возможно после пробоподготовки, заключающейся в растворении липосом в четыреххлористом углероде с последующей экстракцией дистиллированной водой.

Водный экстракт лизомустина анализировали методом ВЭЖХ. Условия анализа:

- колонка Lichrosorb RP-18 250×4 мм, 5 мкм;
- температура колонки – комнатная;
- подвижная фаза – смесь спирта метилового и 0,01 М водного раствора калия фосфата однозамещенного в соотношении 1:9;

инжектируемый объем пробы 10 мкл, скорость потока подвижной фазы 0,8 мл/мин, длина волны детектора 230 нм.

На хроматограмме лизомустин представлен двумя пиками, отношение площадей которых соответствует соотношению изомеров в препарате.

Время удерживания изомеров 1 и 2, 11,2 и 12,3 мин, соответственно. На модельных смесях, полученных с использованием изомеров 1 и 2, подтверждена корректность указанного подхода.

Метод позволяет количественно определить изомерный состав лизомустина в липосомальной лекарственной форме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Уральского отделения РАН (проекты 09-П-3-2001 и 09-И-3-2004) и Государственной программы поддержки ведущих научных школ (НШ-65261.2010.3).

Ю.М. Краснопольский¹, А.Е. Степанов², В.И. Швец²
**ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ
 ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ
 ЛИПОСОМАЛЬНЫХ
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ОНКОЛОГИИ**

¹НТУ «Харьковский политехнический институт»,

²МГАТХТ им. М.В. Ломоносова

Задачи исследования. Эффективность лечения в значительной степени связана со снижением токсического действия противоопухолевых препаратов, а также защитной функцией ряда вспомогательных препаратов. Задачей исследования явилось создание липосомальных лекарственных препаратов (ЛЛП), использование которых позволит повысить эффективность противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. При получении ЛЛП использованы природные фосфолипиды, лекарственные противоопухолевые субстанции и криопротекторы. Для получения и контроля ЛЛП разработаны и валидированы технологические и аналитические методы получения и контроля липосом (Лс), содержащих гидрофильные и гидрофобные вещества.

Результаты и выводы. Предложена технологическая схема получения ЛЛП, включающая основные стадии: получение липидной субстанции и раствора лекарственной субстанции; получение Лс и включение в них лекарственного средства; осветляющая и стерилизующая фильтрация; розлив, замораживание и лиофилизация препарата; контроль готового препарата. Проведено изучение влияния на образование Лс и включение в них лекарственной субстанции ряда факторов: температуры, давления, величины pH, заряда и размера Лс, жирнокислотного состава и продуктов перекисного окисления липидов, соотношения между липидным компонентом и содержанием криопротектора, соотношения липида и лекарственной субстанции и других параметров. Проведено изучение влияния температуры на растворение лиофилизированного продукта. Проведены исследования по изучению стабильности в процессе хранения разработанных лекарственных препаратов. Предложены методы контроля готового препарата, включающие физико-химические, фармакологические и микробиологические методики. Продолжаются работы по включению противоопухолевых препаратов в Лс.

Предложены ЛЛП, содержащие противоопухолевые лекарственные субстанции (Липодокс, Липоплат), а также ряд ЛЛП для вспомогательной терапии (Липин, Липофлавон). Препараты прошли необходимый объем доклинических и клинических исследований, зарегистрированы в Украине и внедрены в промышленное производство.

*В.Н. Кулаков¹, Н.Л. Шимановский², Т.А. Бабушкина³,
 Т.П. Климова³, А.А. Липенгольц¹, В.Ф. Хохлов¹,
 Е.Ю. Колдаева⁴, Е. Кадырова⁴*

**ЭКСПРЕСС ОЦЕНКА
 ПЕРСПЕКТИВНОСТИ
 НАНОРАЗМЕРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

¹ФМБФ им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва

²РГМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

³РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

⁴Институт ЭС РАН, Москва

Наноразмерные системы доставки лекарственных препаратов (5–250 нм) обладают повышенной способностью преодолевать различные биологические барьеры, увеличивают время полувыведения и используются для адресной доставки лекарственного средства

(ЛС) в фармакологическую мишень. Наиболее интенсивно для адресной доставки ЛС, используются полимеры, наноболочки, дендримеры, полимерные мицеллы и конъюгаты полимер–лекарственное вещество. Создание наноразмерных ЛС диагностического и терапевтического назначения существенно расширяет возможности диагностики и терапии онкологических заболеваний. Методы экспресс оценки перспективности наноразмерных ЛС ускоряют исследования в этом направлении.

Задачи исследования. Экспериментальная оценка перспективности наноразмерных ЛС.

Материалы и методы. Методы УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Содержание гадолиния в биологических образцах оценивали методом рентгенофлуоресцентного и нейтроно-активационного анализа. Экспериментальные модели опухоли – мыши и крысы с перивисными опухолями. ЛС – на основе соединений бора и комплексов Gd и Bi.

Результаты и выводы. Предлагаемая схема оценки состоит из следующих этапов: 1) отбор ЛС по физико-химическим свойствам (растворимость, стабильность в водных средах при физиологических значениях pH); 2) отношение количества ЛС в водимой дозе/LD₅₀ не менее 5; 3); эффективность в исследованиях на клеточном уровне (для ЛС терапевтического назначения); 4) релаксивность R1 (ммоль⁻¹с⁻¹, при B0 = 0,20 Т) на уровне гадопентеттата; 5) фармакокинетическая оценка – отношение концентраций опухоли/нормальная ткань не менее 3 в течении 30–60 м (терапевтические ЛС), время и путь элиминации ЛС из организма. Полученные результаты показывают удовлетворительное совпадение результатов экспресс оценки с данными углубленного изучения ЛС. Разработанный метод экспресс оценки перспективности наноразмерных ЛС может быть использован в исследованиях по разработке новых наноразмерных ЛС.

*В.Н. Кулаков¹, Н.Л. Шимановский², В.О. Панов³,
 А.А. Липенгольц¹, В.Ф. Хохлов¹, Е.Ю. Григорьева³,
 Э.А. Караханов⁴, А.Л. Максимов⁴*

**ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ
 НАНОРАЗМЕРНЫХ
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
 ДЛЯ БИНАРНОЙ ЛУЧВОЙ ТЕРАПИИ
 ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

¹ФМБ им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва

²РГМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

³РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Бинарная лучевая терапия обеспечивает локальное, непосредственно в ткани опухоли, вторичное выделение энергии, обеспечивая минимальную лучевую нагрузку на нормальные ткани.

По этой причине разработка препаратов, содержащих необходимые элементы для вторичного энерговыделения, является актуальной. Следует подчеркнуть, что лекарственные средства, в состав которых входят парамагнитные металлы, например Gd³⁺, представляют собой контрастные средства для МР-диагностики. Поиск лекарственных средств обычно осуществляется по следующим направлениям: эмпирический поиск, получение связанных с низко- или высокомолекулярными биомолекулами соединений, приготовление сложных лекарственных форм (липосомы, дендримеры и подобные конъюгаты).

Задачи исследования. Экспериментальное подтверждение накопления лекарственных средств, синтезированных в соответствии с предложенным дизайном, в злокачественных новообразованиях.

Материалы и методы. Строение синтезированных веществ подтверждено данными УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Содержание гадолиния в образцах по данным рентгенофлуоресцентного анализа находится в диапазоне 5–11 %. Экспериментальную модель – саркому С-45 получали введением в бедро суспензии 5×10^6 опухолевых клеток. Накопление образцов в опухоли регистрировали методом МРТ. Размер опухоли составлял 1 см^3 , вводимая внутривенно или внутрибрюшинно доза в пересчете на Gd составляла от 6 до 15 мг на крысу массой 250–280 г.

Результаты и выводы. Результаты МРТ исследования крыс с введением в качестве контраста синтезированных образцов свидетельствуют о накоплении Gd в опухолевой ткани. Полученные результаты подтверждают перспективность использования разработанного дизайна в создании контрастных и специальных для бинарной ЛТ лекарственных средств.

В.Б. Лощенов

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ В МЕДИЦИНЕ

Институт ОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

В настоящее время в мировой практике развивается несколько направлений по разработке наночастиц, обладающих высокими диагностическими характеристиками и/или терапевтическим эффектом.

Одной из самых важных областей их использования является онкология. Вместе с тем активно развиваются исследования в области применения наночастиц в трансплантологии, косметологии и лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

В представленной работе анализируются основные характеристики наночастиц, которые могут быть использованы в биомедицине.

В докладе рассматриваются наночастицы:

- на основе красителей, которые в настоящее время в мономолекулярной форме используются как фотосенсибилизаторы. Оцениваются их достоинства и недостатки с точки зрения диагностической контрастности, возможной токсичности и терапевтической эффективности;
- на основе металлов (Au, Fe, Ni). Оцениваются особенности их применения для диагностики онкологических заболеваний и способы терапевтического воздействия (магнитное воздействие, воздействие лазерными импульсами);
- на основе полупроводниковых элементов и их соединений (Si, квантовые точки).

Будут рассмотрены особенности приготовления коллоидных субстанций для различных способов введения наночастиц в живой организм на примере экспериментальных животных (мышь с привитыми опухолями).

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № П544).

В.М. Мушта, А.В. Вельц, А.В. Иванов, М.В. Уткина, А.А. Степанков

ЛАЗЕРНЫЙ КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВА НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ – ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва
ДЦ «Кронштадт», Москва*

Одной из эффективных и доступных медицинской технологий скрининга, зарекомендовавшей себя при массовых испытаниях состояния здоровья различных возрастных и профессиональных групп населения, подвергшихся техногенному воздействию, является многопараметрическое исследование субфракционного состава биологических жидкостей с помощью лазерной корреляционной спектроскопии. Специфичность и чувствительность этой медицинской технологии для выделения групп повышенного онкологического риска нам удалось повысить за счет использования модифицированного метода лазерного корреляционного анализа (ЛКА). Основным отличительным фактором является то, что биологические жидкости исследуются при температуре более 80°C , за счет чего устраняются случайные, не свойственные организму ассоциации частиц, образовавшиеся в процессе забора, хранения и подготовки образца к исследованию. Это дает возможность количественно определять концентрацию несвойственных организму высокомолекулярных ассоциатов, выдерживающих температурные воздействия и, соответственно, определяющих степень риска онкозаболевания. Были разработаны методики исследования биологических жидкостей (слюны и сыворотки крови), которые позволяют определять степень онкологического риска онкозаболеваний в относительных единицах от «нормы».

Массовая доля нереперентных частиц в образце сыворотки крови здоровых доноров не превышает 40 нг/мл, в риске онкозаболевания – от 40 до 80 нг/мл, онкобольные – от 80 и выше.

Алгоритм последующей работы с выделенными группами риска состоит в следующем:

- пациентам, которые по результатам анализа вошли в группу «норма» рекомендуется проводить повторные анализы ЛКА раз в 6 месяцев;
- пациентам, оказавшимся в группе с положительной тенденцией уменьшения риска (по сравнению с базовым анализом), рекомендуется проводить профилактическую терапию и повторные анализы ЛКА 1 раз в 3 месяца;
- пациентам, у которых нет существенных положительных сдвигов (по отношению к базовому) требуется более детальное клиническое обследование.

Предлагаемая медицинская технология позволяет количественно определять нереперентные частицы в образцах биологических жидкостей, отслеживать динамику состояния водно-белковой среды организма при коррекции гомеостаза.

В.Н. Никифоров

МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Задачи исследования. Для применения в магнитной сепарации, магнитно-резонансной томографии, магнитной гипертермии и других приложениях разрабатываются методы метрологического контроля магнитных наночастиц. На сегодня это достаточно сложная задача, поскольку в диапазоне размеров 1–100 нанометров многие методы работают на пределе разрешения и полученные разными методами данные не всегда коррелируют. Задачей исследования является использование бесконтактных дальнедействующих неразрушающих магнитных методов нанодиагностики для наночастиц магнитных оксидов железа размерами 4–20 нм.

Материалы и методы. Использовались магнитные методы диагностики: SQUID, ЯМР и ЭПР. Исследовались наночастицы оксида железа, полученные разными методами.

Результаты. Разработаны методы магнитной нанодиагностики магнитных оксидов железа размерами 4–20 нм. Экспериментально получены распределения магнитных наночастиц по размерам и определены средние размеры.

Результаты измерений находятся в хорошем соответствии с рентгеновскими данными и результатами электронной просвечивающей микроскопии. В магнитной нанодиагностике существуют нерешенные проблемы. Не определен вклад поверхности в магнетизм наночастиц. Роль поверхностных таммовских состояний в магнетизме наночастиц оксида железа размерами менее 10 нм обсуждается.

Выводы. Дополнение известных методов нанодиагностики новыми магнитными методиками показало свою эффективность.

Д.В. Новиков, А.Д. Перенков, Е.Ю. Контрощикова, С.В. Новикова, К.А. Коровушкина, А.Ю. Барышников, В.В. Новиков

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА CD38 В ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГАХ ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

*НИИ молекулярной биологии и региональной биологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород
Нижегородская государственная медицинская академия
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

Введение. Одним из направлений онкодиагностики является исследование характера экспрессии генов с помощью биочипов и других нанобиотехнологических подходов.

Среди множества генов, способных менять свою экспрессию при онкозаболеваниях, изменения в экспрессии характерны и для генов, белковые продукты которых участвуют в передаче сигналов.

Одним из них является ген, кодирующий дифференцировочную молекулу CD38, известную как активационный антиген лимфоцитарных клеток, цАДФ-рибоза-метаболизирующий фермент и молекула адгезии. Задачей настоящей работы явился анализ встречаемости в опухолевых клетках больных раком тела матки и больных миомой альтернативных вариантов мРНК гена CD38, в сравнении с содержанием продуктов трансляции и посттрансляционной модификации, проявляющейся в образовании растворимых производных мембранной формы белка CD38.

Материалы и методы. Матричную РНК CD38 антигена выявляли ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров. Содержание суммарной и олигомерной фракции белка определяли разработанными ранее иммуоферментными методами.

Для определения CD38-положительных мононуклеарных клеток использовали метод непрямой иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител ИКО-20.

Результаты. Частота обнаружения полноразмерной мРНК CD38 антигена в образцах клеток опухолевых очагов больных раком эндометрия и миомы матки составила 19 % и 27 % соответственно.

У больных раком тела матки и миомой матки, не имеющих мРНК CD38 в клетках опухолевых очагов, обнаружена тенденция к увеличению в крови содержания суммарной и олигомерной фракций растворимых молекул CD38.

У одного больного раком тела матки, а также у одного больного миомой матки в клетках опухолевых очагов обнаружена альтернативная форма мРНК CD38 антигена, кодирующая молекулу, не содержащую внеклеточный регион. Данные больные имели низкий сывороточный уровень общей и олигомерной

фракции CD38 антигена. В крови больных раком тела матки и миомой обнаружено повышение относительного количества CD38-положительных мононуклеарных клеток в сравнении с нормой.

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

*С.В. Новикова¹, Н.А. Сахарнов¹,
Д.В. Новиков¹, А.В. Алясова²*

ОТСУТСТВИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ПРОМОТОРНЫХ РЕГИОНАХ ГЕНОВ FAS И IL-2RA КЛЕТОК ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГОВ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

*¹НГУ им. Н.И. Лобачевского
²НГМА*

Задачи исследования. Развитие опухолевого процесса сопровождается нарушениями экспрессии генов Fas и IL-2RA в клетках опухолевых очагов.

Пониженный уровень экспрессии или мутации гена Fas являются механизмами ухода опухолевой клетки из-под иммунного надзора путем снижения чувствительности клеток к апоптозу.

Повышение уровня экспрессии гена IL-2RA в неопластической клетке является одним из молекулярных механизмов экспансии опухолевых клонов и ассоциировано с высоким уровнем злокачественности опухоли. Для промотора гена Fas обнаружены полиморфизмы, ассоциированные с Т-клеточной лейкемией и раком молочной железы.

Для промотора гена IL-2RA – с диабетом I типа. Вовлечение молекул Fas и IL-2RA в процессы опухолевого роста позволяет предположить наличие ассоциации однонуклеотидных замен в промоторных регионах генов с развитием неопластического процесса.

Целью работы явился анализ первичной структуры промоторных регионов генов Fas и IL-2RA в клетках опухолевых очагов больных раком толстого кишечника.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились 24 образца клеток опухолевых очагов больных раком толстого кишечника.

Амплификацию ДНК промоторных участков генов Fas и IL-2RA проводили методом ПЦР с использованием сконструированных авторами праймеров, специфичных последовательностям промоторных регионов генов, с последующим электрофорезом в агарозном геле.

Фрагменты ДНК вырезали из геля и выделяли с использованием набора DNA Extraction Kit (Fermentas, Латвия) согласно рекомендациям производителя. Определение нуклеотидной последовательности промоторных участков Fas и IL-2RA проводили с помощью генетического анализатора ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Результаты и выводы. Первичные последовательности хромосомных ДНК промоторных участков генов Fas и IL-2RA сравнивали между собой и с последовательностями хромосомных ДНК промоторных участков данных генов, полученными в международной базе данных EMBL Gene Bank.

В результате сравнения обнаружено, что во всех 24 образцах клеток опухолевых очагов больных раком толстого кишечника промоторные участки генов Fas и IL-2RA не содержали однонуклеотидных замен.

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

С.В. Новикова¹, Д.В. Новиков¹, Т.В. Белова¹,
Е.С. Плеханова¹, Р.Г. Пегов², А.В. Алясова²

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АЛЬФА-ЦЕПИ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГОВ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

¹НГУ им. Н.И. Лобачевского

²НГМА

Задачи исследования. Функции альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 (IL-2RA, CD25 антигена) в гемopoэтической системе хорошо известны. Однако роль CD25 АГ в канцерогенезе до сих пор не изучена. Известно, что IL-2RA экспрессируется на опухолевых клетках многих типов. При РЛ показана чрезмерная экспрессия CD25 антигена в опухолевых клетках, что связано с повышением активационного статуса, пролиферативной активности и устойчивостью к лекарствам.

Целью работы явилась оценка частоты встречаемости альтернативных форм матричной РНК CD25 антигена в клетках опухолевых очагов больных РЛ.

Материалы и методы. Исследовали 32 образца клеток опухолевых очагов больных раком легкого. Характер экспрессии гена α-цепи рецептора интерлейкина-2 определяли методом ОТ-ПЦР с использованием разработанных авторами праймеров, специфичных к местам соединения экзонов мРНК. Нуклеотидную последовательность кДНК определяли с помощью генетического анализатора ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Результаты и выводы. В тестированных образцах были обнаружены полноразмерная и две альтернативные формы мРНК CD25 антигена. Анализ первичной структуры альтернативных форм мРНК CD25 показал делецию 4-го экзона (CD25Exo4Del) в одной форме и делецию 4-го и 5-го экзонов (CD25Exo4-5Del) в другой. Полноразмерная форма мРНК CD25 антигена в клетках опухолевых очагов больных раком легкого была обнаружена в 100 % случаев. Альтернативная форма CD25Exo4Del была выявлена в 53 % исследованных образцов (17 из 32). В 38 % случаев (12 из 32) была обнаружена альтернативная форма CD25Exo4-5Del. Из них 6 образцов (19 %) содержало обе альтернативные формы, и 6 образцов – форму CD25Exo4-5Del без CD25Exo4Del. Вариации пула мРНК гена CD25 в клетках опухолевых очагов больных раком легкого могут являться отражением механизмов регуляции опухолевого роста, в которые вовлечены полноразмерная форма мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 и альтернативные формы мРНК, кодирующие неактивные белки.

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

Т.В. Осипова¹, З.А. Соколова¹, Н.Б. Паклин²,
В.И. Карасева¹, Т.П. Рябых¹

ДИАГНОСТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ БИОЧИПА. ОДНОВРЕМЕННОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ШЕСТИ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²МГУЭ, СиС (Рязанский филиал), Рязань

Серологические опухолевые маркеры: простатический специфический антиген общая и свободная формы (ПСАобщ и ПСАсв), альфа-фетопротеин (АФП), раково-эмбриональный антиген (РЭА), нейронспецифическая

енолаза (НСЕ) и хорионический гонадотропин (ХГЧ) играют существенную роль в диагностике и мониторинге злокачественных заболеваний. Ранее было показано, что разработанная на основе микрочипа диагностическая система, позволяющая одновременно количественно измерять две формы ПСА, имеет характеристики, сравнимые с традиционными иммуноферментными тест-системами (Т.В. Осипова с соавт., 2008 г.).

Задачи исследования. Испытание новой диагностической системы в формате микрочипа для одновременного количественного определения в сыворотке крови онкологических больных шести опухолевых маркеров: ПСАобщ, ПСАсв, АФП, РЭА, НСЕ и ХГЧ, а также сравнение диагностической эффективности новой многофакторной системы с традиционными системами.

Материалы и методы. В работе использовали диагностическую систему «ОМ Биочип», разработанную на основе гелевых микрочипов (ИМБ им. В.А. Энгельгарда РАН) с применением флуоресцентного «сэндвич-варианта» иммуноанализа. В исследования было включено 170 образцов сыворотки крови пациентов. Из них – 108 больных с различными формами рака (рак предстательной железы, колоректальный рак, гепатобластома, трофобластическая болезнь и др.) и 62 – больных неопухолевыми заболеваниями (доброкачественная гиперплазия предстательной железы, колит, цирроз, хронический панкреатит и др.) и здоровых доноров. Диагностическую эффективность новой тест-системы оценивали с помощью математических методов ROC-анализа и логистической регрессии. Эффективность системы определялась площадью под ROC-кривой (AUC).

Результаты. Установлена высокая корреляция между результатами, полученными в новой тест-системе на основе биочипа и в тест-системах CanAg и DRG Diagnostics. Коэффициенты корреляции составили: для АФП – 0,97 ($p < 0,01$); для РЭА – 0,95 ($p < 0,01$); для ПСАобщ – 0,94 ($p < 0,01$); для ПСАсв – 0,91 ($p < 0,01$); для ХГЧ – 0,91 ($p < 0,01$); для НСЕ – 0,71 ($p < 0,01$). Результаты логистической регрессии и ROC-анализа показали, что диагностическая эффективность многофакторной системы с учетом возраста больного значительно выше, чем в тест-системах, определяющих один маркер. Площади под ROC кривыми (AUCs) для каждого маркера в отдельности и для комбинации шести маркеров с учетом возраста: АФП AUC = 0,601; РЭА AUC = 0,541; ХГЧ AUC = 0,516; ПСАобщ AUC = 0,514; ПСАсв AUC = 0,556; НСЕ AUC = 0,553; возраст AUC = 0,699; комбинация маркеров AUC = 0,860 ($P < 0,001$). * – достоверность отличий значений AUC для каждого маркера в отдельности от комбинации маркеров.

Выводы. Диагностическая система в формате микрочипа для одновременного количественного определения нескольких опухолевых маркеров позволяет получать результаты, сопоставимые с данными измерений в традиционных диагностических фирм CanAg и DRG Diagnostics. Применение многофакторной тест-системы на основе микрочипа может существенно улучшить эффективность диагностики злокачественных новообразований.

В.Г. Пегов¹, А.Ю. Барышников², А.В. Иванов^{1,2}

АППАРАТУРА ДЛЯ КОНТРОЛЯ РАЗМЕРОВ НАНОЧАСТИЦ

¹ООО «Новые энергетические технологии», Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

e-mail: pevgov@bk.ru; ivavi@yandex.ru

Эффективность накопления наночастиц в живых клетках зависит от физических параметров этих частиц. Было показано, что клетки более охотно накапливают наночастицы размерами от 25 до 50 нм.

По этой причине при создании и производстве наноматериалов одной из ключевых проблем является организация оперативного контроля концентрации и размеров наночастиц, их стандартизация. Наночастицы по условиям их получения и/или существования, как правило, не являются монодисперсными и количественная информация об их фракционном составе, т.е. о распределении наночастиц по размеру, требуется на всех стадиях технологического цикла производства продукции. Измерения необходимо производить надежно и оперативно (в масштабе времени, близком к реальному).

В настоящее время размеры наночастиц определяют в большинстве случаев с помощью электронных микроскопов и сканирующих зондовых микроскопов. Однако, при весьма высокой стоимости они сложны в применении и принципиально непригодны для исследования наночастиц, которые существуют только в жидкой фазе (инъекционных растворов, наноструктурированных лекарственных препаратов и биологических жидкостей). Ввиду этого использование таких приборов в производственном процессе является очень сложной задачей. Указанных недостатков лишены спектрометры квазиупругого рассеяния света. Они компактны, позволяют измерять распределение наночастиц по размерам непосредственно в жидкой среде, не требуют сложной подготовки проб и могут применяться в промышленном производстве.

В ООО «Новые энергетические технологии» ведутся исследования по разработке спектрометров квазиупругого рассеяния света. В настоящее время создано несколько образцов для измерения размеров нанобъектов в диапазоне размеров 0,3–10000 нм. В докладе проводится сравнение методов измерения размеров наночастиц, рассматриваются достоинства метода квазиупругого рассеяния света и пути улучшения характеристик лазерных корреляционных спектрометров.

А.В. Рябова, А.В. Попов, Ю.К. Воронько, В.Б. Лощенов
ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ
БОРАТНЫХ ПОЛИКРИСТАЛЛОВ И СТЕКОЛ,
ДОПИРОВАННЫХ ИОНАМИ Nd^{3+}
В АСПЕКТЕ НЕЙТРОНЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ
С ВОЗМОЖНОСТЬЮ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ НАВИГАЦИИ
ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Настоящая работа посвящена изучению особенностей спектроскопических характеристик наночастиц на основе боратных поликристаллов и стекол, активированных ионами Nd^{3+} , для нейтронзахватной терапии с возможностью флуоресцентной навигации.

Поликристаллические боратогерманаты $\text{Gd}_{14}(\text{BO}_3)_6(\text{GeO}_4)_2\text{O}_8:\text{Nd}^{3+}$ (Nd^{3+} : 0,5, 3,0, 7,0 ат%) получали при 1520K методом твердофазного синтеза. Лантан-боратные стекла получали путем смешивания B_2O_3 , La_2O_3 и Nd_2O_3 агентов с чистотой 99,99 %, плавления, литья и дальнейшего отжига. Водные коллоиды наночастиц получали из приготовленных поликристаллов и стекол путем последовательного измельчения сначала в агатовый ступке, затем при ультразвуковом (мощность ультразвукового генератора 10 Вт) диспергировании в воде. Размер гидродинамического радиуса наночастиц оценивался с помощью спектрометра динамического рассеяния света Photocor Complex.

Для регистрации спектров люминесценции ионов Nd^{3+} в частицах использовался волоконно-оптический спектрометр ЛЭСА-01-Биоспек (в том числе для регистрации люминесценции *in vivo*). Модификация ЛЭСА-01-Биоспек заключалась в дополнительном использовании непрерывного ИК лазера с длиной волны 810 нм, изготовлением и заменой оптических фильтров.

Нами проведено предварительное исследование фармакокинетики наночастиц поликристаллов $\text{Gd}_{14}(\text{BO}_3)_6(\text{GeO}_4)_2\text{O}_8$: 7 ат% Nd^{3+} на лабораторных мышах с перевитыми опухолями карциномы Эрлиха в мышечную ткань задней лапы. Водный коллоид наночастиц (объем 0,2 мл, концентрация 2 мг/мл) вводили внутривенно. Доза введенного препарата в расчете на массу животного составила 16 мг/кг. С помощью флуоресцентной спектроскопии установлено распределение этих наночастиц по органам и тканям мыши спустя час после введения.

Распределение по органам существенно зависит от нескольких факторов: от размеров наночастиц, от поверхностного заряда наночастиц, от типа используемого полимерного покрытия наночастиц. Для развития этого направления представляется важным провести исследование по влиянию этих параметров на распределение наночастиц по тканям и органам в норме и при некоторых патологиях, в частности при злокачественных опухолях и атеросклеротических изменениях сосудов.

**Т.П. Рябых¹, З.А. Соколова¹, В.Н. Морозов²,
Н.Б. Паклин³, В.И. Грабко⁴, Т.В. Осипова¹**
НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ
В ОНКОЛОГИИ

НА ОСНОВЕ МИКРО- И НАНОЧИПОВ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ИТЭБф, РАН, Москва

³МГУЭСИ (Рязанский филиал), Рязань

⁴ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Задачи исследования. Создание и применение в онкологии многопараметрических диагностических систем на основе микро- и наночипов, позволяющих проводить одновременное определение нескольких опухолевых маркеров в минимальном объеме сыворотки крови человека. Оценка диагностических характеристик новых систем.

Материалы и методы. В работе использованы диагностические системы на основе следующих технологий: технологии биочипов на основе трехмерных гидрогелей (ИМБ РАН), технологии наночипов (Morozov et al., 2007) и технологии микроочипов на основе микроочипов (Novogen, США). Концентрацию 10 опухолевых маркеров (АФП, РЭА, ПСАобщ, ПСАсв, ХГЧ, НСЕ, СА 19-9, СА 15-3, СА 125, пролактин) определяли при помощи сэндвич-иммуноанализа с флуоресцентной детекцией (микроочипы) и детекцией с помощью магнитных микроочипов (наночипы). Сыворотка крови была получена от 170 пациентов: 108 больных злокачественными новообразованиями различных локализаций (рак предстательной железы, кишечника, гепатобластома, трофобластическая болезнь и др.) и 62 больных другими заболеваниями (доброкачественная гиперплазия предстательной железы, колит, цирроз, хронический панкреатит и др.), а также здоровых доноров. Способность новой системы классифицировать пациентов на больных и не больных злокачественными заболеваниями оценивали с помощью ROC-анализа. Для оценки площади под ROC-кривой (AUC) и расчета линейной и логистической регрессии использовали статистический пакет MedCalc.

Результаты. Показано, что в сыворотке крови больных онкологическими заболеваниями может наблюдаться повышение не одного, а целого ряда опухолевых маркеров. Одновременное определение нескольких опухолевых маркеров с помощью микроочипов позволяет существенно улучшить диагностическую эффективность при классификации:

1. На больных злокачественными заболеваниями и больных неопухолевыми заболеваниями.
2. При выявлении определенного типа опухоли среди больных ЗНО.

Применение диагностической системы на основе наночипов позволяет существенно увеличить аналитическую чувствительность определения опухолевых маркеров (на примере ПСА).

Выводы. Новые мультиплексные диагностические системы на основе микро- и наночипов позволяют существенно увеличить эффективность диагностики злокачественных новообразований по сравнению с системами, позволяющими определять один опухолевый маркер, а также повысить чувствительность определения опухолевых маркеров.

*Е.В. Санарова, Е.В. Игнатьева,
А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова*

ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАЦИИ НА ВКЛЮЧЕНИЕ ГИДРОФОБНОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ТИОСЕНСА В ЛИПОСОМЫ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования. Данное исследование ставило перед собой задачу выяснить влияние этапа фильтрации на процент включения в липосомы гидрофобного фотосенсибилизатора Тиосенса, используемого для фотодинамической терапии опухолей.

Материалы и методы. Липосомы получали из фосфатидилхолина (лецитина яичного), холестерина, PEG-2000 PE в молярном соотношении 1:0,22:0,002. Весовое соотношение препарат/липиды составляло 0,0045/1. Для изготовления липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) Тиосенса создавали тонкую липидную пленку, путем упаривания хлороформного раствора липидов и препарата на роторном испарителе, а затем смывали полученную пленку определенным количеством дистиллированной воды. В работе были использованы дисперсии липосомального Тиосенса до и после экстракции, а также раствор стандартного образца субстанции препарата. Процесс фильтрации производили на экструдере под давлением через поликарбонатные фильтры (Whatman) с размером пор 0,45 и 0,22 мкм. Размер везикул определяли на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp 380. Эффективность включения определяли спектрофотометрически при длине волны 720±4 нм на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО (Россия).

Результаты. Включение Тиосенса в липосомы до фильтрации составило 59,1 % (диаметр везикул 678±20 нм), после экстракции через фильтр с размером пор 0,45 мкм – 56,3 % (Ø везикул 306±20), в результате стерильной фильтрации (размер пор фильтра 0,22 мкм) содержание препарата снизилось до 53,6 % (диаметр везикул 142±20 нм).

Выводы. На основании полученных данных можно сделать вывод о снижении процента включения Тиосенса в липосомы в результате процесса фильтрации, при этом за счет экстракции через фильтр с размером пор 0,45 мкм теряется 2,7 %, а через 0,22 мкм – 5,5 %. Показатели потерь будут использованы для корректировки дозы препарата в ЛЛФ.

*Н.А. Сахарнов¹, Д.В. Новиков¹, Р.Г. Пегов²,
Т.В. Белова¹, Е.С. Плеханова¹, А.В. Алясова²*

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МРНК FAS-АНТИГЕНА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

*НГУ им. Н.И. Лобачевского
НГМА*

Задачи исследования: Механизмы Fas-зависимого апоптоза клеток включены в процессы онкогенеза.

Система Fas-Fas-лиганд имеет множественные пути регуляции, в том числе с участием растворимых форм Fas-антигена. Растворимые формы образуются в результате альтернативного сплайсинга мРНК первичного транскрипта.

Целью настоящей работы явилась характеристика экспрессии гена APT-1(FAS) в опухолевых клетках при раке легкого.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились 19 образцов клеток опухолевых очагов, полученных из Нижегородского областного онкологического диспансера при резекции опухолей у больных раком легкого. Матричную РНК Fas-антигена детектировали методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к местам соединения экзон-пре-мРНК Fas антигена.

Результаты и выводы: В клетках опухолевых очагов больных раком легкого обнаружено 6 различных вариантов мРНК Fas антигена. Матричная РНК мембранной формы Fas-антигена детектировалась у 73,7 % (14 из 19) больных. У 4 больных не было выявлено ни одной мРНК альтернативных форм Fas-молекулы, и у 1 больного (на 3 стадии) при отсутствии мРНК мембранной формы Fas выявлялась одна из альтернативных растворимых форм (Fas del 3,4). Матричная РНК доминирующей растворимой формы молекулы Fas с делецией 6 экзона обнаруживалась у 10 из 19 больных (52,6 % случаев). Матричные РНК пяти минорных форм с делециями 3, 4, 5 и 6 экзон в различных комбинациях встречались с частотой от 42,1 % до 57,9 %. Всего было выявлено 9 различных спектров альтернативных форм мРНК Fas, различающихся по числу и составу форм.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

*З.С. Смирнова¹, Л.М. Борисова¹, М.П. Киселева¹,
Е.В. Санарова¹, Е.А. Лукьянец², Г.А. Меерович³*

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ТИОСЕНСОМ-ЛИО НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ФГУП «ГНЦ» НИОПИК, Москва

³ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Введение. Тиосенс является новым отечественным фотосенсибилизатором с максимумом поглощения в области 723±2нм, в которой собственное поглощение биологических тканей минимально. Тиосенс-лио – сублимированная липосомальная лекарственная форма Тиосенса, разработанная в РОНЦ.

Цель исследования. Изучение противоопухолевой эффективности ФДТ с использованием Тиосенса-лио на перевиваемых опухолях мышей.

Материалы и методы. Исследования *in vivo* проведены на мышах-гибридах линий F₁, BDF₁ и DBA₂. Эффективность ФДТ с использованием Тиосенса-лио изучена на аденокарциноме Эрлиха (ELD), эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LLC) и лимфолейкозе Р-388, перевитых внутримышечно в правую голень за 4, 5 и 7 дней до проведения ФДТ, соответственно. Тиосенс-лио вводили в хвостовую вену в дозе 6 мг/кг за 5 ч до лазерного облучения с плотностью мощности 400 мВт/см² в течение 20 мин. Критерием эффективности ФДТ служило торможение роста опухоли (ТРО, %) в опытной группе мышей по сравнению с контрольной.

Результаты. На аденокарциноме Эрлиха у мышей показана высокая противоопухолевая активность Тиосенса-лио, на 7 день от начала лечения ТРО составляет 56 %.

Далее противоопухолевый эффект сохраняется на высоком уровне: к 14 дню лечения ТРО достигает 76 %, а к 28 дню – 70 % ($p < 0,05$). На лимфолейкозе Р-388 также установлена высокая противоопухолевая эффективность ФДТ с Тиосенсом-лио, ТРО составляет 71 % ($p < 0,05$). На эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LLC) по критерию ТРО не удалось показать эффективность ФДТ с Тиосенсом-лио. ТРО на 4 день лечения достигает максимального значения – 34 %, а затем снижается.

Выводы. В ходе проведенных экспериментов показана высокая эффективность ФДТ с Тиосенсом-лио на перевиваемых опухолях мышей: аденокарциноме Эрлиха (ELD) и лимфолейкозе Р-388.

Д.В. Соколова, Е.В. Тазина, М.А. Кортава, Е.В. Игнатьева, А.П. Полозкова, П.К. Иванов, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ANTI-MUC1 ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДОКСОРУБИЦИНА

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

В РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН разработана иммунолипосомальная форма доксорубина, направленная против MUC1 антигена-мишени с высокой степенью включения препарата и выраженной антигенспецифичностью *in vitro*.

Цель исследования. Оценить цитотоксическую активность анти-MUC1 иммунолипосомального доксорубина в сравнении с традиционной и липосомальной лекарственной формой (ЛФ), а также выявить возможное цитотоксическое действие пустых иммунолипосом и моноклональных антител (МКА), используемых в качестве вектора.

Материалы и методы. Оценку цитотоксического действия проводили при помощи МТТ-теста на клеточных линиях SKOV-3 (аденокарцинома яичников) и T47D (карцинома молочной железы). Исследовали 6 концентраций препарата: 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 0,625 мкг/мл. Исследуемые образцы инкубировали с клетками в течение 1 ч при 4 °С. После этого клетки отмывали и оставляли в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO₂ на 71 ч. За 6 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили раствор МТТ. По окончании инкубации клетки ресуспендировали в ДМСО и определяли оптическую плотность на спектрофотометре «Multiscan» при длине волны 530 нм.

Результаты. На клетках линии T47D достоверных различий при сравнении традиционной ЛФ доксорубина и иммунолипосомальной ЛФ в концентрациях 20 мкг/мл и 10 мкг/мл не выявлено. Так, при концентрации препарата 20 мкг/мл процент выживших клеток составляет 37,7 % и 35,8 % соответственно, а при концентрации 10 мкг/мл – 46,2 % и 45,7 %. LD₅₀ для липосомальной формы доксорубина на исследуемых концентрациях не достигается. В отношении клеток линии SKOV-3 при сравнении традиционной и иммунолипосомальной ЛФ также не выявлено достоверных различий. При концентрации доксорубина 18 мкг/мл выживаемость клеток составила 49,9 % и 45,8 % соответственно. LD₅₀ для липосомальной формы доксорубина на исследуемых концентрациях также не достигается. При исследовании пустых иммунолипосом и МКА, в соответствующих концентрациях, цитотоксическое действие не выявлено.

Выводы. Анти-MUC1 иммунолипосомальная форма доксорубина проявляет больший цитотоксический эффект в отношении MUC1⁺ клеток, в сравнении с липосомальной ЛФ, соизмеримый с традиционной ЛФ препарата. Пустые иммунолипосомы, как и МКА, не обладают цитотоксическим действием.

Д.В. Соколова, Е.В. Тазина, М.А. Кортава, Е.В. Игнатьева, А.П. Полозкова, П.К. Иванов, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников

АНТИ-MUC1 ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА ДОКСОРУБИЦИНА: ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНОСТЬ *IN VITRO*

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Повышение эффективности лекарственной терапии злокачественных новообразований продолжается по разным направлениям, одно из которых заключается в разработке рациональных лекарственных форм противоопухолевых препаратов.

Цель исследования. Получение анти-MUC1 иммунолипосом, нагруженных доксорубином, для адресной доставки к опухолевым клеткам-мишеням.

Материалы и методы. Иммунолипосомы получали методом обращения фаз из лецитина, холестерина, пегилированного 1,2-дистеароил-сп-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DSPE-PEG –2000), и pNp-PEG lipid в мольных соотношениях 7:4:0,15:0,05. Загрузку доксорубина осуществляли против градиента сульфата аммония. Весовое соотношение препарат:липиды составило 0,16:1. В качестве вектора использовали моноклональные антитела (МКА) ICO-25, обладающие специфичностью к MUC1 АГ. Очистку иммунолипосомальной суспензии осуществляли методом гель-фильтрации с помощью хроматографической колонки, заполненной сефадексом G-50. Содержание препарата определяли спектрофотометрически. Калибровку иммунолипосом по размеру проводили с помощью ручного мини-экструдера. Размер везикул определяли на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp-380 (США). Определение общего белка в препарате иммунолипосом проводили с бичинхониновой кислотой, а также рассчитывали количество молекул МКА, приходящееся на липосому. Оценку специфичности связывания иммунолипосом проводили на клеточных линиях SKOV-3 (аденокарцинома яичников) и T47D (карцинома молочной железы) с помощью непрямого иммунофлюоресцентного метода.

Результаты. Включение доксорубина в иммунолипосомы составило 89–91 %; размер везикул – 140±5 нм; количество молекул МКА, приходящееся на одну липосому – 21±3. Специфичность связывания анти-MUC1 иммунолипосом с антигенположительными клетками-мишенями линии SKOV-3 составила 96±4 %, с клетками линии T47D – 88±6 %.

Выводы. Отработана технология получения анти-MUC1 иммунолипосомальной формы доксорубина с высокой степенью включения препарата и выраженной антигенспецифичностью *in vitro*.

З.А. Соколова, Т.В. Осипова, Т.П. Рябых, В.И. Карасева, В.Б. Матвеев, А.Ю. Барышников
ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ОБЩЕЙ И СВОБОДНОЙ ФОРМ ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА В ФОРМАТЕ БИОЧИПА: ХАРАКТЕРИСТИКИ И ВОЗМОЖНОСТЬ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Простат-специфический антиген (ПСА) является общепризнанным опухолевым маркером и широко используется в клинической практике в целях ранней диагностики РПЖ. Одновременное измерение концентрации 2 форм ПСА – общей и свободной (ПСАобщ и ПСАсв) и определение %ПСАсв способствует значительному увеличению диагностической эффективности ПСА-теста в дифференциальной диагностике РПЖ и доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ).

Задачи исследования. Испытание новой отечественной диагностической системы в формате биочипа для одновременного количественного измерения двух форм ПСА (ОМ-Биочип(ПСА)). Оценка и сравнение диагностической эффективности системы «ОМ-Биочип(ПСА)» с традиционными иммуноферментными системами Fujirebio Diagnostics, применив статистический метод ROC-анализ.

Материалы и методы. В работе использовали диагностическую систему ОМ-Биочип (ПСА), на основе гелевых микрочипов (ИМБ им. В.А. Энгельгардта). Уровень опухолевых маркеров определяли методом одностадийного иммунофлуоресцентного «сэндвич»-анализа. В исследование было включено 223 образцов сыворотки крови пациентов, из них – 28 здоровых доноров, 54 – с ДГПЖ, 54 – больных с разными формами уrogenитального рака и 87 – с РПЖ. ROC – анализ проводили с использованием пакета статистической программы MedCalc.

Результаты. Тест-система «ОМ-Биочип (ПСА)» имела удовлетворительные аналитические характеристики: чувствительность 0,2 нг/мл, воспроизводимость измерений в образцах сыворотки крови КВ $\leq 10\%$, процент «открытия» 102 и 107 % для общей и свободной формы ПСА, соответственно. Полученные в тесте на линейность величины находились в пределах $\pm 10\%$ от ожидаемых величин.

Регрессионный анализ показал высокую степень корреляции (ПСАобщ $r=0,96$; $p<0,0001$, ПСАсв $r=0,94$; $p<0,0001$) данных определения двух форм ПСА в тест-системе в формате биочипа и иммуноферментной системе Fujirebio Diagnostics. Результаты ROC-анализа показали, что одновременное определение двух форм ПСА и их соотношение имеет диагностическую эффективность, позволяющую достаточно надежно дифференцировать исследуемую группу больных РПЖ от группы здоровых доноров, больных ДГПЖ и иными злокачественными уrogenитальными заболеваниями. Площади под ROC-кривыми для двух тест-систем в группах сравнения достоверно не различались ($p<0,05$) и диагностическая эффективность новой системы не уступала эффективности традиционных ИФА систем Fujirebio Diagnostics.

Выводы. На основании полученных данных показана применимость первой отечественной диагностической системы «ОМ-Биочип (ПСА)» в формате биочипа в своевременной диагностике РПЖ в группах высокого риска (мужчины старше 45 лет). Отечественная тест-система «ОМ-Биочип (ПСА)» является экономичной, эффективной альтернативой традиционным ИФА-системам.

А.Б. Соловьева¹, П.И. Толстых², Г.И. Караханов³,
Н.Н. Глаголев⁴, А.В. Иванов⁴

**ФДТ ТРУДНОЗАЖИВАЮЩИХ
ОЖОГОВЫХ РАН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
В КАЧЕСТВЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА
ФОТОДИТАЗИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО
НА НАНОЧАСТИЦАХ ГИДРОКСИАПАТИТА**

¹ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

²ГНЦ Лазерной медицины МЗ и СР РФ, Москва

³Грозненский ожоговый центр

⁴РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Ранее было показано, что некоторые амфифильные полимеры повышают активность порфириновых фотосенсибилизаторов в сеансах ФДТ в отношении опухолевых клеток, поверхностных опухолей и огнестрельных ран у лабораторных животных. Цель данной работы – исследование эффективности использования композиции на основе комплексов диглюкаминовой соли хлори-

на еб (фотодитазин, ФД) с амфифильными полимерами (АП), иммобилизованных на наночастицах гидроксиапатита (ГА) в (ФДТ) трудно заживающих ожогов и ран. Исследовано также влияние иммобилизации комплексов на ГА на эффективность фотогенерации синглетного (1O_2) кислорода в модельных условиях. Обнаружено, что активность системы ФД-АП-ГА в фотогенерации 1O_2 зависит от механизма связывания ФД наночастицами ГА, природы полимера и экстремально зависит от содержания ГА в системе. Возрастание эффективности фотогенерации 1O_2 , возможно, связано со стабилизацией в результате иммобилизации на наночастицах ГА наноразмерных агрегатов ФД поскольку с ростом размеров агрегатов порфириновых фотосенсибилизаторов в растворе их активность в растворе уменьшается. При ФДТ осложненных ожогов с использованием иммобилизованных на ГА комплексов ФД-АП в области патологического очага происходило ускоренное очищение ран от раневого детрита и уменьшение микробной обсемененности, наблюдалось ускорение перехода воспалительной фазы раневого процесса в репаративную и сокращение сроков заживления на 7–9 суток по сравнению с традиционным методом лечения.

Системы ФД-АП-ГА оказались эффективнее обычно используемых при ФДТ гнойных ран фотосенсибилизаторов – холосенса и фотодитазина (в форме геля), возможно, как за счет стабилизации мономерных форм ФД, иммобилизованных на наноразмерном ГА, так и в связи с уменьшением микробной обсемененности раневой поверхности и стимуляцией процессов репарации тканей в присутствии наночастиц ГА. Такие системы могут оказаться эффективными при лечении ряда онкологических заболеваний кожи, слизистых, мочевого пузыря и т.д.

Работа выполнена при поддержке РФФИ
(грант 10-02-00381).

С.А. Староверов^{1,2}, О.А. Гасина³,
А.А. Кладиев⁴, В.А. Богатырев¹

**ВОЗДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА ПРОСПИДИН –
КОЛЛОИДНОЕ ЗОЛОТО
НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**

¹ИБФРМ РАН, Саратов

²СГАУ им. Н.И. Вавилова, Саратов

³СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

⁴Биотехнологическая компания ТНК, Москва

Задачи исследования. Высокая токсичность противоопухолевых препаратов зачастую приводит к необратимым разрушениям тканей организма. Использование золотых наночастиц (ЗНЧ) как объектов, способствующих проникновению лекарственного вещества внутрь клеток, позволяет снизить негативный эффект препарата.

Целью данной работы является исследование возможности доставки комплекса, состоящего из противоопухолевого препарата и золотых наночастиц, в онкоклетки.

Материалы и методы. В качестве лекарственного препарата использовался проспидин – высокоэффективный противоопухолевый препарат, обладающий цитостатическим действием. В качестве биологических объектов – модельные клеточные линии человеческих (HeLa) и свинных (SPEV-2) опухолевых клеток.

Для исследования локализации ЗНЧ, конъюгированных с проспидином в клетках применялся оригинальный метод использования смешанных меток в темнопольной и стандартной конфокальной микроскопии, основанный на усилении светимости ЗНЧ в результате их взаимодействия с флуорофором.

Изучение функциональной активности клеток, взаимодействующих с лекарственным комплексом, проводили при помощи колориметрического теста по определению дыхательной активности.

Результаты и выводы. При изучении цитостатического воздействия чистого проспирина в малой концентрации было отмечено угнетение дыхательной активности клеток на 10 %, но при воздействии проспирина в той же концентрации в комплексе с коллоидным золотом, дыхательная активность клеток подавлялась на 60 % за счет усиления проникновения данного комплекса внутрь клеток путем эндоцитоза, благодаря транспортной функции ЗНЧ. Предположительно, внутри клеток происходит диссоциация комплекса, и препарат проникает в ядра и связывается с ДНК. Благодаря этому возможно снижение терапевтических доз и уменьшение побочных эффектов препарата при использовании его в комплексе с коллоидным золотом. Следует отметить, что чистое коллоидное золото стимулирует дыхательную активность клеток.

Ю.В. Стукалов, А.С. Масько, Н.С. Калыгина,
Е.Ю. Колдаева, Е.Ю. Григорьева

ДЕНДРИМЕРЫ КАК ОСНОВА НАНОКОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ РАДИОТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Основным недостатком существующей лучевой терапии является то, что при облучении опухоли воздействию подвергаются и здоровые ткани. Актуальность работ в области таргетной радиоиммунотерапии (клеточно-направленная доставка радионуклида с помощью специфических носителей к очагам опухолевого роста) несомненна. Подходящим инструментом для решения этой проблемы являются дендримеры. Дендримеры (размер 5–10 нм) могут попадать в опухолевые клетки и впоследствии, после разрушения раковой клетки, безопасно отфильтровываться почками. Кроме того на поверхности дендримеров имеется множество функциональных групп, необходимых для создания наноконструкций.

Цель работы – создание новых высокоэффективных радиофармацевтических препаратов для онкологической практики и способов их доставки в опухоль.

Для ее решения были использованы наноконструкции на основе дендримеров с опухолеспецифичными агентами и радионуклидами. В качестве опухолеспецифичных агентов использованы моноклональные антитела, а радионуклида – рений-188 в виде перрената натрия. В ходе работы планировалось решить следующие основные задачи: разработать схемы синтеза и осуществить синтез дендримеров нового класса; на их основе создать конструкции с моноклональными антителами и рением-188; оценить острую токсичность дендримеров и эффективность конструкций *in vitro*.

Результаты. В качестве ядра дендримеров использовали пентаэритрит. По реакции Вильямсона получали тетрааллиловый эфир, далее эпоксицированием моноадреталевой кислотой по Прилежаеву получали тетраэпоксид. Реакция тетраэпоксида с диэтаноламином продуцировала дендример с 8 гидроксильными группами, который превращали по реакции Вильямсона с аллилбромидом в дендример, содержащий 8 аллильных групп. Структура дендримера подтверждена ЯМР- и масс-спектрами. Для связывания перрената с конструкцией использовали сафранин. Частично эпоксицированный дендример конденсировали с сафранином и моноклональными антителами (анти-ICO-80 (CD5), ICO-25 (MUC1)).

Полученные наноконструкции протестировали *in vitro*. Через 0,5 ч культивирования клеток (Jurkat (Т-лимфобластная лимфома) или Raji (лимфома Беркитта)) с наноконструкциями количество погибших клеток составляло 57 %, через 1 ч – 98 % и далее не менялось и составляло 98–99 %.

Изучение острой токсичности дендримеров показало их безвредность для экспериментальных животных. Максимально переносимая доза дендримера составила 250 мг/кг массы тела, абсолютно смертельная – 1000 мг/кг массы тела, а средне смертельная – 500 мг/кг массы тела.

Выводы. Экспериментально подтверждена высокая противоопухолевая эффективность наноконструкций, показана биологическая безопасность дендримеров.

С.С. Сухарев¹, И.В. Решетов¹, Е.Н. Славнова² АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ЗАДАЧАХ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ НАНОКОНСТРУКЦИЙ

¹ФГОУ ИПК ФМБА России», Москва

²ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росздрава, Москва

Задачи исследования. Представляемые опыты явились частью научно-исследовательской работы, посвященной изучению свойств разрабатываемой терапевтической наноконструкции (ТНК). В состав ее входят антитела к эпидермальному фактору второго типа (HER2/Neu), белковая комплексирующая часть и ионы – прообразы будущей эффекторной части. Была поставлена задача изучения сохранности функций ТНК после воздействия на них плазмы крови, физраствора и кровезаменителей. Такие опыты – необходимая часть характеристики устойчивости ТНК к воздействию внутренней среды организма.

Материалы и методы. Ожидаемая концентрация ионов – прообразов эффекторной части ТНК существенно меньше распознаваемой современными методами качественного элементного анализа. Поэтому было решено оценивать сохранность тропности ТНК к HER2-положительным клеткам РМЖ по степени ингибирования иммуноцитохимической реакции (ИЦХ) после инкубации с растворами, содержащим ТНК, а сохранность функции доставки эффекторной части – косвенно, сравнением шероховатости поверхности ядер клеток с шероховатостью ядер клеток, инкубированных с раствором ТНК, не претерпевших воздействия физиологических жидкостей или их заменителей. Использовался клеточный материал от пациентов, страдающих РМЖ с интенсивной продукцией HER2/Neu. Цитологические препараты после проведения обработки растворами, содержащими ТНК, подвергали ИЦХ и получали сканы их поверхностей средствами атомно-силовой микроскопии.

Результаты и выводы. И в результате ИЦХ, и в результате обработки растворами ТНК по периферии клеток средствами АСМ визуализировались «бортики». Ингибирование ИЦХ выражалось в легко документируемом уменьшении высоты и ширины этих «бортиков» на отдельных участках вплоть до исчезновения.

Те клетки, на которых рецепторы HER2 должны были быть заняты ТНК, характеризуются высокими значениями шероховатостей поверхностей (от 64 до 83 нм) в отличие от тех, на которых не должно было быть ТНК (например, после обычной ИЦХ шероховатость поверхностей клеток составляет от 20 до 30 нм).

Таким образом, хотя АСМ не позволяет визуализировать ТНК или иммунокомплексы, метод дает возможность по косвенным признакам мониторировать свойства тропности ТНК к опухоли-ассоциированным антигенам и их способность к доставке эффекторных частей в опухолевый очаг.

Е.В. Тазина, Е.В. Игнатьева, Н.А. Оборотова
**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ
 КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 СОДЕРЖАНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА
 В ТЕРМОЛИПОСОМАХ**
 РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Установление соответствия качества лекарственных средств регламентируемым нормам предполагает применение различных аналитических методов. При этом окончательный вывод о качестве лекарства в значительной степени зависит от качества самого метода, который должен отвечать определенным требованиям. Процесс лабораторного изучения степени пригодности аналитических методов называется валидацией. Цель валидации – подтверждение обоснованности выбора метода для определения показателей качества фармацевтической продукции по каждому разделу нормативной документации. В РОНЦ разработана термочувствительная липосомальная лекарственная форма доксорубина для использования в комбинации с локальной гипертермией (40–43 °С).

Целью данного исследования являлась валидация методики количественного определения содержания доксорубина (Докс) в термоллипосомальной лекарственной форме (Докс-ТЛ).

Материалы и методы. Содержание Докс в Докс-ТЛ определяли методом спектрофотометрии с использованием рабочего стандартного образца (РСО) Докс при длине волны 252 ± 2 нм. Валидацию методики количественного определения проводили по следующим параметрам: воспроизводимость, правильность, повторяемость (сходимость), специфичность (селективность) и линейность. Для оценки воспроизводимости использовали *F*-критерий (критерий Фишера), для подтверждения правильности – *t*-критерий Стьюдента, для оценки сходимости – фактор $L(P, n)$, вычисленный по Пирсону. Для подтверждения специфичности методики готовили модельные смеси с разными концентрациями анализируемого вещества. Результаты оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Для проведения градуировки методики измеряли оптическую плотность модельных смесей с разными концентрациями Докс.

Результаты. Спектрофотометрическая методика с использованием РСО Докс оказалась воспроизводимой, давала правильные результаты, не содержала систематической ошибки и позволяла достоверно определять действующее вещество в присутствии вспомогательных веществ. Результаты количественного анализа Докс в модельных смесях, а также в лекарственной форме описывались линейной зависимостью $y = 0,00139 + 0,04324x$ с коэффициентом корреляции $R = 0,99927$.

Выводы. С помощью метода спектрофотометрии можно довольно точно оценивать содержание действующего вещества в лекарственной форме, при этом вспомогательные вещества практически не влияют на поглощение Докс и не мешают его определению.

А.А. Темнов¹, Н.Б. Лысков¹, А.Н. Склифас²,
 Н.И. Кукушкин², А.В. Терещенко³, Ю.А. Белый³
**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ
 ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ**

**ПЕРФТОРУГЛЕРОДНЫХ ЭМУЛЬСИЙ,
 СОДЕРЖАЩИХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР,
 В СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА**

¹НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

²Институт биологии клетки РАН, Пушкино

³Калужский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Росмедтехнологии»

Цель работы – изучить возможности сорбции фотосенсибилизатора радахлорин на наночастицах перфто-

руглеродной (ПФУ) эмульсий, включения наночастиц с радохлорином в стволовые клетки костного мозга мышей и транспортировки его в организме реципиента.

Материалы и методы. Радахлорин сорбировали на наночастицах ПФУ эмульсии, состоящей из смеси перфторуглеродов. В качестве доноров клеток использовали мышей линии C57black10 GFP, цитоплазма которых содержит белок, флюоресцирующий под действием УФ-излучения. Клетки костного мозга выделяли из бедренной кости и культивировали в среде DMEM в течение 5 дней при 37 °С. После этого к клеткам добавляли наночастицы, содержащие радахлорин, и инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. После 5-кратной отмывки раствором Хенкса клетки снимали трипсином и трансплантировали реципиенту в/в и в/брюшинно в дозе 20×10^6 клеток. Реципиентами являлись мыши линии C 57 black, не содержащие GFP. Через 3–7 дней после трансплантации животных забивали, извлекали костный мозг и готовили клеточную суспензию. Под микроскопом в УФ диапазоне проводили поиск клеток, содержащих зеленый белок, после обнаружения клетки облучали лазером (662 нм) мощностью 1 Дж в течение 1 мин. Затем в видимом свете проводили фотографирование облученной клетки в течение 3 мин с интервалом 15 сек.

Результаты. Установлено, что при инкубации наночастиц ПФУ эмульсий с радахлорином последний сорбируется на частицах ПФУ эмульсий и при инкубации их со стволовыми клетками проникает внутрь клеток и длительно (до 20 сут) находится в клетках, не меняя их морфологически и функционально. В экспериментах *in vivo* показано, что клетки, содержащие наночастицы с радахлорином, в течение 5–7 дней после трансплантации в организм реципиента сохраняют свою функциональную активность и при воздействии лазерного излучения образуют активные формы кислорода, что приводит к гибели клеток.

Заключение. Введение стволовых клеток, транспортирующих лекарственные препараты, представляется перспективным в различных отраслях медицины, в том числе в онкологии. Это позволит суммировать терапевтический эффект стволовых клеток с терапевтическим эффектом лекарственных препаратов.

Г.С. Терентюк¹, А.В. Иванов², Н.И. Полянская²,
 И.Л. Максимова¹, А.А. Скапцов¹, Б.Н. Хлебцов¹,
 Н.Г. Хлебцов¹

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
 ЛАЗЕРНОГО ФОТОТЕРМОЛИЗА
 С ЗОЛОТЫМИ
 ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫМИ
 НАНОЧАСТИЦАМИ**

¹СГУ им Н.Г. Чернышевского, Саратов

²РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Представлены сравнительные данные по кинетике лазерного нагрева суспензий золотых наноболочек на ядрах из двуокиси кремния, золотых наностержней и золотых наноклеток. При равной оптической плотности на длине волны плазмонного резонанса и лазерного нагрева (около 800 нм), все три типа частиц суспензий показали близкие фототермические параметры, однако эффективность нагрева в расчете на единицу массы золота убывала в ряду наноклетки, наностержни и наноболочки. Для расчета спектров экстинкции и рассеяния использован метод связанных дипольных сфер с аналитическим усреднением сечений экстинкции и поглощения наночастиц по их хаотическим ориентациям. Наночастицы моделировались ансамблем взаимодействующих металлических наносфер с небольшим самопересечением и поляризуемостью, вычисляемой из первого коэффициента Ми.

Показано, что суспензии всех трех типов частиц имеют примерно одинаковую эффективность конверсии света в тепло. Однако это вовсе не означает одинаковой эффективности в расчете на одну частицу или в расчете на массу частиц в единице объема.

Опуская детали анализа и расчета, приведем данные для концентрации золота в указанных препаратах: наноболочки – 150 мкг/мл, наностержни – 90 мкг/мл, наноклетки – 40 мкг/мл. Таким образом, в расчете на общую массу металла (и тем более золота) наивысшую фототермическую эффективность показывают наноклетки, затем наностержни (примерно в 2 раза ниже в расчете на золото) и наноболочки (примерно в 5 раз ниже в расчете на золото).

Экспериментальные исследования по фототермолу опухолей проводились на мышах линии Balb/c с перевитой внутримышечно опухолью Эрлиха. В хвостовую вену вводились растворы золотых наностержней и золотых наноклеток. Опухоль облучалась полупроводниковым лазером в непрерывном режиме на длине волны 800 нм через сутки после введения. Плотность мощности составляла 5 Вт/см², длительность лазерного облучения 5 мин. Температурная динамика как при введении наностержней, так и при введении наноклеток качественно сходна, при введении разведенного раствора (в 8 раз) повышение температуры составляло 7 °С по сравнению с температурой облучаемых контрольных участков без введения наночастиц, а при введении концентрированного раствора золотых наночастиц среднее повышение температуры составляло 25 °С.

Можно сделать вывод, что внутривенное введение золотых наночастиц с высокой концентрацией и оптимальное пассивное накопление их в опухоли позволяет эффективно осуществлять локальный фототермол опухоли.

*Г.С. Терентюк, Н.Г. Хлебцов,
И.Л. Максимова, В.В. Тучин*

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

СГУ им Н.Г. Чернышевского, Саратов

Первые упоминания о применении коллоидного золота в лечебных целях встречаются в трактатах древнекитайских и индийских ученых V–IV веков до нашей эры. В средние века в Европе коллоидное золото рекомендовалось Парацельсом и врачом французского короля Людовика XIII Давидом де Плани-Кампи в качестве эликсира долголетия. Основоположителем систематического научного изучения синтеза и физико-химических свойств коллоидного золота можно считать М. Фарадея (1857). В 20 веке были достигнуты определенные успехи в лечении ревматоидного артрита солями золота и в терапии онкозаболеваний при использовании растворов изотопа золота ¹⁹⁸Au.

Новая эра в использовании коллоидного золота в биологии и медицине открылась работой Г. Френса (1973), посвященной методам синтеза коллоидного золота с определенным заранее заданным размером частиц. С этого момента началось активнейшее использование биоспецифических маркеров – конъюгатов коллоидного золота в различных областях биологии.

Применение плазмонно-резонансных золотых наночастиц в биомедицине имеет два основных аспекта: биоспецифическое «нацеливание» на определенные ткани или клетки и оптический плазмонный резонанс. Оптический плазмонный резонанс обусловлен когерентными колебаниями свободных электронов металла под действием электрической компоненты световой волны.

Эти колебания приводят к увеличению рассеяния и поглощения света на резонансных длинах волн, обусловленных мультипольностью тензора поляризуемости. При воздействии лазерным излучением с длиной волны, соответствующей пику поглощения наночастиц, можно достичь локального нагрева наночастиц и окружающих их клеток или локализованного выделения инкапсулированного лекарственного вещества.

Первый способ лежит в основе фототермической терапии, тогда как второй вариант тесно связан с адресной доставкой лекарств.

Для того, чтобы осуществить эффективную фототермическую терапию злокачественных новообразований, необходимо согласовать три важных фактора: длину волны лазерного излучения, максимум поглощения излучения золотыми наноструктурами, которые используются как селективные поглотители, и спектральную прозрачность биоткани для лазерных импульсов. Как известно, «оптическое окно прозрачности» биоткани соответствует ближней ИК-области спектра и ограничен диапазоном 750–1100 нм.

На сегодняшний день основными направлениями исследований в области применения золотых наночастиц в биологии и медицине можно считать изучение различных аспектов токсичности и биораспределения золотых наночастиц, использование золотых наночастиц для контрастирования злокачественных новообразований в методе темнопольной микроскопии, низкокогерентной оптической томографии, спектроскопии диффузного светорассеяния.

Для успешного контрастирования изображений, получаемых указанными оптическими методами достаточно введения золотых наночастиц в относительно небольших концентрациях (порядка 10⁹ частиц на мл), в то время как для контрастирования рентгеновских изображений концентрация должна быть на несколько порядков выше. Получены первые результаты по использованию золотых наночастиц в методиках двух- и трехфотонного возбуждения люминесценции.

В последние годы в ряде исследовательских центров активно развивается методика фототермолу опухолей с использованием золотых наночастиц в качестве термофотосенсибилизаторов. Кроме того, получены результаты, свидетельствующие, что локальная гипертермия с наночастицами повышает чувствительность опухоли к последующим лучевой и ХТ.

*С.Ф. Тимашев, Ю.С. Поляков,
А.Б. Соловьева, П.И. Мисуркин*

НАНОМЕТРОЛОГИЯ ПОВЕРХНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

НИИ им. Л.Я. Карпова, Москва

ИИХФ им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

Представлены принципы параметризации структуры хаотических поверхностей при анализе массивов данных, получаемых методами атомно-силовой микроскопии (АСМ). Предлагаемый подход основан на использовании фликкер-шумовой спектроскопии (ФШС). Его основное отличие от существующих методов параметризации хаотических структур состоит во введении информационных параметров, характеризующих составляющие исследуемых профилей рельефа поверхности в разных диапазонах пространственных частот и реализации необходимых процедур для выделения таких параметров. Показано, что в качестве базовых характеристик, отражающих особенности структуры поверхности в нанометровом диапазоне, следует рассматривать меру «ступенчатости» нанорельефа и меру его «остроизности» как характеристики наиболее высокочастотной составляющей нанорельефа.

Возможности развитой методологии продемонстрированы на примере параметризации АСМ массивов данных для двойных и тройных систем, формируемых на слюде из водных растворов хитозана и порфиринового фотосенсибилизатора – димегина.

Интерес к таким системам связан с исследованиями в водных растворах модельных для фотодинамической терапии процессов фотоиндуцируемого окисления органических субстратов. Определенные для таких систем параметры и характер изменения топографии поверхности при переходе от двойной к тройной системе указывают на проявление взаимодействий, приводящих к конформационным подстройкам всех компонентов тройной системы. Это отражается и в фиксируемых визуально качественных изменениях АСМ изображений. Можно полагать, что такие конформационно проявляемые взаимодействия реализуются и в водных растворах тройных систем НМХ-F127-димегин. Именно с формированием таких комплексов в растворе естественно связывать обнаруженное ранее повышение скорости фотосенсибилизированного окисления триптофана при введении в реакционную систему НМХ и плуроника F127. Предложенный метод может быть использован для параметризации текстуры изображений, сделанных оптическими методами, например при анализе срезов биологических тканей для диагностирования состояния тканей.

В. А. Ханадеев^{1*}, Б.Н. Хлебцов¹, Л.А. Дыкман¹,
В.А. Богатырев^{1,2}, И.Л. Максимова², Г.С. Терентюк²,
Н.Г. Хлебцов^{1,2}

НАНОЧАСТИЦЫ С НАСТРОЙКОЙ ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

¹ИБФРМ РАН, Саратов

²СГУ им. Н. Г. Чернышевского, Саратов

*e-mail: khanadeev@ibppm.sgu.ru

Представлены результаты по синтезу, оптическим свойствам и применениям трех типов композитных наночастиц: золотых нанооболочек (15–20 нм) на ядрах из двуокиси кремния (120–140 нм), золотых наностержней (толщина 10–15 нм, длина 30–90 нм) с серебряной нанооболочкой толщиной 1–4 нм и золото-серебряных наноструктур («nanoboxes», «наноклетки», размер 50–60 нм), синтезированных на шаблонах из серебряных кубиков с размером порядка 40–50 нм. Получена контролируемая настройка плазмонных резонансов экстинкции и светорассеяния синтезированных наноструктур в диапазоне длин волн 400–900 нм. Представлены сравнительные данные по кинетике лазерного нагрева золотых нанооболочек, золотых наностержней и золотосеребряных наноклеток в экспериментах *in vitro*. Разработан метод количественного биоимиджинга с использованием резонансного рассеяния от золотых нанооболочек.

О.В. Хугаева, Н.П. Яворская, И.С. Голубева,
М.А. Кортава, Д.В. Соколова, Е.В. Тазина,
Е.В. Игнатова, А.П. Полозова А.Ю. Барышников,
Н.А. Оборотова, И.И. Краснюк

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ МИТОКСАНТРОНА

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Кардиотоксичность антрациклинов – один из основных факторов, ограничивающих применение антибиотиков антрациклинового ряда в клинике. Поскольку частота проявления кардиотоксического действия зависит от дозы и резко повышается при высоких кумуля-

тивных дозах, противоопухолевую активность митоксантрона нельзя использовать полностью. В связи с этим включение препарата в липосомы позволяет не только использовать его в полном объеме, но и повысить дозу препарата. Последнее возможно в связи с измененной фармакокинетикой препарата, его меньшим накоплением в сердечной мышце.

Цель исследования. Изучить противоопухолевую активность различных лекарственных форм митоксантрона.

Материалы и методы. Противоопухолевую активность трех лекарственных форм изучали *in vivo* на перививаемых опухолях мышей: аденокарциномы молочной железы Ca-755 и лимфолейкозе Р-388. В опытах использовали мышей-гибридов линии BDF1 самок массой 18–21 г. Сформированные группы животных содержались в условиях вивария РОНЦ на стандартном рационе брикетированных экструдированных кормов со свободным доступом к питьевой воде. Критериями эффективности служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни по сравнению с контрольными группами (УПЖ, %).

Результаты. При исследовании противоопухолевой эффективности трех различных форм митоксантрона на мышах с опухолью аденокарциномы молочной железы Ca-755 установили, что эффективность липосомальной формы митоксантрона в дозе 0,52 мг/кг составляет от 93–100 % ТРО и превышает противоопухолевое действие субстанции митоксантрона в дозе 3,1 мг/кг (ТРО 78–89 %). Более высокая эффективность липосомальной формы митоксантрона в сравнении с субстанцией, подтверждена на экспериментальной модели лимфолейкозе Р-388. УПЖ в дозе 1,6 мг/кг составило 259 % и 194 % соответственно и в дозе 0,52 мг/кг – 140 % и 79 % соответственно.

Выводы. Удалось снизить дозу митоксантрона в 6 раз, не теряя специфической активности липосомальной формы, и повысить биодоступность препарата. Увеличение продолжительности жизни для липосомального митоксантрона с дозой 0,52 мг/кг составило 105 %.

Н.А. Цыганова¹, М.В. Рыжова¹, Р.М. Хайруллин¹,
Б.Н. Хлебцов², Л.А. Дыкман², В.А. Богатырев^{2,3},
Д.Е. Суетенков⁴, И.Л. Максимова³, Г.С. Терентюк³,
Н.Г. Хлебцов^{2,3}

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ ПРИ ПАРАНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

¹Ульяновский государственный университет, Саратов

²ИБФРМ РАН, Саратов

³СГУ им. Н. Г. Чернышевского

⁴СГМУ им. Разумовского

e-mail: khanadeev@ibppm.sgu.ru

Широкое распространение наноматериалов в медицине требует конкретных знаний по накоплению и воздействию наночастиц (НЧ) на организм человека и животных. Имеющиеся сведения о токсичности золотых НЧ (ЗНЧ) противоречивы. Эксперимент проведен на белых крысах в стандартных условиях вивария. Животным, разделенным на 5 групп (по 6 крыс в каждой), внутривенно вводили растворы ЗНЧ под шифрами К-шеллы, КЗ-50, NC (кейджи), NR (стержни) с концентрацией золота 50 мкг/мл (2 мл/кг). Группе контрольных животных вводили физраствор (2 мл/кг). Наблюдение за животными проводили в течение 2 недель. Летальных исходов не зафиксировано. На 15 сутки животных выводили из эксперимента. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии установлено, что ЗНЧ в основном накапливаются в печени и селезенке животных.

Морфологические исследования показали, что внутривенное введение раствора К-шеллы вызывает разрывы стенок альвеол, очаговое утолщение межальвеолярных перегородок. Капилляры расширены, заполнены эритроцитами. В печени наблюдается некроз отдельных гепатоцитов, отмечаются клетки с явлением кариопикноза и кариорексиса. В почках встречаются отдельные извитые канальцы с лизированными ядрами, цитоплазма эпителиоцитов вакуолизирована. Для селезенки характерны расширенные сосуды фолликулов, красная пульпа полнокровна. У животных, получавших раствор KZ-50, наблюдается зернистость цитоплазмы гепатоцитов, отмечаются пенистые клетки с фрагментированными ядрами. В почках наблюдаются очаги разрушения отдельных групп извитых канальцев, ядра клеток в этих участках пикнотичны или не определяются. После введения раствора NC отмечаются полнокровные сосуды, вакуолизация и кариолизис гепатоцитов. В корковом слое почек встречаются группы извитых канальцев с гипохромно окрашенной цитоплазмой и коллабирование почечных клубочков. Введение раствора NR обуславливает полнокровные сосуды и цитоллиз отдельных нейроцитов головного мозга крыс. В печени этих животных наблюдается дискомплексация печеночных балок, отдельные очаги кровоизлияний и лизис ядер гепатоцитов. В почечной ткани гипохромное окрашивание проксимальных извитых канальцев и коллабирование почечных клубочков.

А.С. Шатурова, Е.А. Дудко, Т.А. Богущ

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ β_1 В СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ НАНОЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования. В настоящее время в клинической практике определение статуса эстрогеновых рецепторов опухоли проводится полуколичественно при иммуногистохимическом исследовании экспрессии эстрогенового рецептора α (ЭР α). Однако прогностическая значимость эстрогенового рецептора второго типа – ЭР β (точнее, его полноразмерной изоформы ЭР β_1) порождает необходимость дифференцированного и строго количественного определения уровня экспрессии этого маркера, чему посвящено данное исследование.

Материалы и методы. Методом наночитофлуориметрии исследована экспрессия ЭР β_1 в клетках культуры рака молочной железы MCF-7 и в клетках хирургических образцов рака молочной железы. Использовали антитела: первичные моноклональные к ЭР β_1 (NCL-ER β , Novocastra), вторичные поликлональные (IgG, конъюгированный с FITC – F2772, Sigma), изотипическое антитело – IgG2a (ab18414, Abcam). Среднюю специфическую флуоресценцию клеток оценивали с помощью программы WinMDI, количество специфически окрашенных клеток определяли методом Колмогорова-Смирнова.

Результаты. 1. Для анализа и длительного хранения клеток оптимальной признана фиксация в 4% р-ре формальдегида. 2. Продемонстрирована четкая зависимость интенсивности флуоресцентного окрашивания и числа специфически окрашенных клеток от количества специфических антител и времени инкубации с ними. 3. Для выявления общего числа клеток, экспрессирующих ЭР β_1 , показана необходимость инкубации клеток с первичными антителами в течении ночи с последующей 1,5-часовой инкубацией с вторичными антителами. 4. При исследовании экспрессии ЭР β_1 в клетках РМЖ воспроизведены все закономерности, описанные в культуре клеток.

Выводы. Разработанный алгоритм иммунофлуоресцентного анализа, базирующийся на проточной наночитофлуориметрии, позволяет количественно оценить число клеток, экспрессирующих ЭР β_1 , в исследуемой опухоли и уровень экспрессии рецепторов в каждой клетке. Метод хорошо воспроизводим, объективен и пригоден для рутинной клинической практики.

Поддержано Грантами РФФИ № 09-04-13560 и № 10-04-00551

*М.В. Ширманова¹, М.Л. Бугрова¹, В.В. Елагин¹,
А.А. Брилкина², Е.А. Сергеева³, И.В. Балалаева²,
М.А. Сироткина¹, Е.В. Загайнова¹*

МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ С НОРМАЛЬНЫМИ И ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ В КУЛЬТУРЕ И ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

¹НГМА, Росздрава

²НГУ им. Н.И. Лобачевского

³ИПФ РАН, Нижний Новгород

Золотые наночастицы (ЗНЧ) рассматриваются как многообещающие агенты для разных приложений в биологии и медицине. Однако механизмы взаимодействия наночастиц с живыми клетками в культуре и в организме мало изучены.

В задачи исследования входило:

- изучение взаимодействия ЗНЧ с нормальными и опухолевыми клетками *in vitro*;
- исследование биораспределения ЗНЧ в организме животных;
- изучение проникновения ЗНЧ в кожу при поверхностном нанесении.

Объектами исследования служили: культуры нормальных (CHO) и опухолевых (SKOV3, SKBR3) клеток, аутбредные мыши CD1, линейные мыши CBA с опухолью рак шейки матки PШМ-5, кожа кроликов и свиней. Использованы ЗНЧ в форме стержней и бипирамид, а также наноболочки SiO₂/Au (ИХФ РАН).

Микроскопический анализ выполнен методами микроскопии в темном поле (Leica DM2500), лазерной сканирующей двухфотонной микроскопии (Carl Zeiss LSM 510 META), трансмиссионной электронной микроскопии (Morgagni 268D).

Результаты показали, что золотые наностержни размером 65–70 нм неспецифически путем эндоцитоза проникают в нормальные и опухолевые клетки *in vitro*. ЗНЧ, конъюгированные с мини-антителами 4D5, специфически связываются с рецепторами HER2/neu на поверхностной мембране HER2/neu – положительных клеток. ЗНЧ, введенные внутривенно мышам в дозе 108 частиц/животное, в наибольшем количестве обнаружены в крови и моче через 4 часа и селезенке и почках через 7 суток после инъекции.

Показано накопление ЗНЧ в опухоли мышей PШМ-5 через 6 ч после внутривенного введения, при этом наночастицы обнаружены как в цитоплазме, так и в ядрах опухолевых клеток.

Установлено проникновение ЗНЧ во все слои здоровой кожи кролика и свиньи через 4 часа после нанесения на поверхность кожи в виде капли коллоидного раствора.

Таким образом, результаты свидетельствуют о перспективе применения ЗНЧ в онкологии ввиду их избирательного накопления в опухоли, быстрого выведения из организма и возможности направленной доставки к опухолевым клеткам.

Однако вопросы биобезопасности наночастиц для организма требуют тщательного изучения.

И.Ж. Шубина¹, И.О. Чикилева¹,
Н.К. Ахматова², М.В. Киселевский¹

ЭКЗОСОМЫ, СЕКРЕТИРУЕМЫЕ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ И ИХ РОЛЬ В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ГУ НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова
РАМН, Москва

В последнее время расширяются исследования по изучению экзосом, представляющих собой наноразмерные мембранные везикулы, секретируемые различными типами гемопоэтических (ретикулоциты, тромбоциты, В- и Т-лимфоциты, тучные клетки, дендритные клетки) и негемопоэтических клеток (эпителиальные клетки, фибробласты).

В отличие от экзотозоа секреторных пузырьков или гранул в ответ на соответствующее возбуждение, экзосомы секретируются во внеклеточную окружающую среду при слиянии специализированных внутриклеточных эндосом – микровезикулярных телец с плазматической мембраной клетки. Экзосомы содержат м-РНК и микро-РНК, способны транспортировать РНК к соседним клеткам, при этом переданная РНК сохраняет биологическую активность и может обеспечить новые функции. Экзосомы, независимо от типа продуцирующих их клеток имеют ряд характерных особенностей, включающих структуру (пузырьки, ограниченные билипидным слоем), размер (50–100 нм), плотность (1,13–1,20 г/мл) и белковый состав (набор цитозольных или мембранных протеинов). Вместе с тем, экзосомы из различных клеточных источников существенно отличаются по белковому составу, который соответствует типу секретирующих их клеток.

Экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками несут не только поверхностные антигены, но также мембранные и цитозольные белки трансформированных клеток, которые могут быть более специфичными, чем сывороточные антигены. В частности, было показано, что экзосомы, секретируемые клетками рака яичников, рака почки, меланомы и др. содержат высокие уровни мембранного белка клаудина, в то время как эти белки не детектируются в плазме онкологических больных. Кроме того, экзосомы опухолевых клеток содержат несколько белков, которые могут также рассматриваться как биомаркеры. При этом, экзосомы, секретируемые из различными новообразованиями, вероятно, имеют не одинаковый белковый состав.

Стрессорные белки, экспрессированные на опухолевых экзосомах могут также оказывать влияние на врожденный и адаптивный противоопухолевый иммунный ответ. Так, БТШ, экспрессируемые на опухолевых экзосомах, являются не только ко-фактором эффективной презентации антигена, но и индуктором созревания ДК. Gastpar и др. убедительно показали, что БТШ (Hsp70) на поверхности экзосом, высвобождаемых клетками линии колоректального рака непосредственно активируют НК, поддерживая их миграционную и цитостатическую функции. Секретируемые опухолевыми клетками экзосомы способны доставлять различные молекулы и модулировать иммунный ответ.

Экзосомы, изолированные от других типов рака могут проявить ингибирующие эффекты на взаимодействия лимфоцитов, их пролиферативные ответы и/или цитотоксичность. Другие ингибирующие эффекты могут включать угнетение экспрессии TCR, или FasL-лиганда. Такие различия в эффектах опухолевых экзосом связываются с особенностями фенотипа опухолевых клеток-продуцентов экзосом и разнообразием механизмов, участвующих в регуляции иммунного ответа.

Роль опухолевых экзосом в противоопухолевом иммунитете остается спорной, а сообщения в литературе относительно их активирующих или ингибирующих эффектов весьма противоречивыми.

Опухолевые клетки могут индуцировать пролиферацию Трег, которые оказывают угнетающее действие на эффекторные клетки иммунитета. Подобным эффектом обладают и экзосомы, экспрессирующие трансформирующий фактор роста β .

Опухолевые экзосомы влияют не только на эффекторные клетки, но также изменяют функциональное состояние АПК. В частности, экзосомы выделяемые трансформированными клетками нарушают дифференцировку ДК из предшественников костного мозга или из моноцитов посредством индукции экспрессии ИЛ-6 клетками-предшественниками. Опухолевые экзосомы не только препятствуют дифференцировке ДК, но они также способствуют развитию фенотипа миелоидных супрессорных клеток, оказывающих отрицательное влияние на эффекторы иммунитета посредством секреции трансформирующего фактора β .

По мнению некоторых исследователей, существующая концепция активизирующего влияния опухолевых экзосом на врожденный иммунитет может вводить в заблуждение, по крайней мере, в случае распространенного опухолевого процесса. Весьма вероятно, что опухолевые экзосомы способствуют «ускользанию» опухоли от иммунологического надзора. Возможно, что на ранних этапах новообразования, опухолевые клетки и экзосомы, которые они продуцируют, еще не приобрели эффективные супрессивные молекулы и механизмы.

При таких условиях, экзосомы могут играть важную роль в переносе антигенов от опухоли к АПК. Однако на фоне прогрессирования заболевания экзосомы становятся способными угнетать различные звенья иммунитета. Идентификация фактора или факторов, определяющих иммуностимулирующее или иммуносупрессивное действие экзосом, может позволить преодолеть способность опухоли ускользать от иммунного воздействия.

С.Ю. Щеголев, Н.А. Остудин, В.А. Богатырев,
А.А. Широков, А.М. Буров

СОВРЕМЕННЫЙ ЦИТО-ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ДИАГНОСТИКЕ И ИССЛЕДОВАНИЮ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ИБФРМ РАН, Саратов

Центр коллективного пользования «Симбиоз», Саратов

Задачи исследования. Освоение и развитие новых иммуногисто-цитохимических методик автоматизации процессов выявления, идентификации и количественного анализа опухолевых клеток.

Материалы и методы. Были исследованы диагностические возможности комбинированных платформ Areol SL-50 System и CytoVision Genetix, основанные на автоматической обработке цифрового изображения, которые позволяют анализировать препараты в проходящем свете и с применением методов флуоресценции. Отмечено, что обеспечиваемые при этом: количественный анализ биомаркеров в иммуногистохимических, иммунофлуоресцентных пробах, при флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH); выявление микрометастазов, ploидности и тканевой принадлежности клеток; изучение ангиогенеза, исследование лимфатических узлов; выявление циркулирующих опухолевых клеток, а также карiotипирование и анализ клеток в метафазе позволяют значительно расширить диагностическую и исследовательскую базу.

Совокупное применение таких методик, как определение *in vitro* HER2/neu (герцептина), рецепторов ER (эстрогена) и PR (прогестерона); количественный анализ амплификации гена HER2/neu в реакции флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH); выявления микрометастазов может служить реальной основой для мониторинга состояния онкологических пациентов в процессе лечения. Зарубежный опыт показал эффективность подобной онкодиагностики и был одобрен американским Управлением по контролю за продуктами и лекарственными препаратами (FDA).

Результаты и выводы. Указанное выше оборудование, программное обеспечение, соответствующие диагностические и исследовательские методики позволяют объективно и с высокой точностью оценить состояние и течение онкологического заболевания на различных стадиях его развития и лечения.

Комбинирование новых биомаркеров и современных автоматизированных методик, а также модернизация последних могут существенно повысить эффективность работ в области онкодиагностики.

Т.Л. Юркинович, Н.В. Голуб, В.А. Алиновская, Р.И. Костерова, Ю.П. Истомин, Е.Н. Александрова
НАНОСОМАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА – ИНТРОНА А

*БГУ «НИИ физико-химических проблем», Минск
РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск*

Введение. Известно, что включение цитостатиков в состав полимеров-носителей увеличивает их эффективность, пролонгирование действия и снижает проявление токсических эффектов.

Цель исследования. Оценка токсичности и противоопухолевой активности водорастворимых и гелеобразующих фосфатов декстрана (ФД) и крахмала (ФК), содержащих фосфорнокислые и карбаматные группы, а также противоопухолевой активности полимерсодержащих препаратов α -2b-интерферона (интрон А).

Материалы и методы. К тестированию были представлены ФД и ФК, полученные этерификацией ортофосфорной кислотой в расплаве мочевины с содержанием фосфорнокислых групп в интервале 7,0-11,8 %. Определение острой токсичности гидрогелей ФД и ФК проведены на крысах (каждая серия по 4 крысы весом 200–250 г). Животным вводилось по 10 г 50% гидрогеля внутривенно. Опыты по оценке противоопухолевой активности проведены в условиях *in vitro* на монослойной культуре опухолевых клеток HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, клон М). Оценку роста культуры опухолевых клеток (цитостатического эффекта) в опытных группах ФД и ФК, а также полимерсодержащей формы интрон А по отношению к контролю проводили на основании показателя эффективности противоопухолевого действия ИК₅₀.

Результаты. Установлено, что фосфаты полисахаридов относятся к классу малотоксичных веществ и LD₅₀ составляет около 5000 мг/кг. Показано, что цитостатическая активность ФД и ФК носит дозозависимый характер.

При фиксированной концентрации фосфорилированных полисахаридов способность ингибировать пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* увеличивается по мере роста в их составе содержания фосфорнокислых групп и не зависит от агрегатного состояния (в виде растворов или в виде микросфер). Обнаружено, что цитостатический эффект полимерсодержащих лекарственных форм интрон А выше инъекционных форм исходного белка и его величина определяется как природой модифицированного полимера, так и массовым соотношением белок : модифицированный полисахарид.

Выводы. Модификация декстрана и крахмала смесью ортофосфорной кислоты и мочевины приводит к образованию малотоксичных соединений, обладающих противоопухолевым действием и эффективных для использования в качестве полимеров-носителей противоопухолевого препарата α -2b-интерферона.

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 горячем указателе Num Lock.

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

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

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

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

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

Не следует параллельно использовать термин и его сокращение. Если сокращений больше 10, следует вводить список сокращений. В статьях должна использоваться система СИ. В тексте должны быть указаны ссылки на таблицы и рисунки, например, **(табл. 1); (рис. 1)** или **на рис. 1 представлены...** Они должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Таблицы должны быть компактными, иметь название, не повторять графики, не должны содержать пустых ячеек (отсутствие данных должно отмечаться тире, «нет данных» или специальным примечанием). Все уточнения и локальные сокращения выносятся в примечания. Таблицы набираются тем же шрифтом, что и основной текст статьи с выравниванием по левому краю, без переносов и красных строк. Точку после последнего слова в ячейке ставить не нужно. Примечания к таблицам выносятся в последней строке таблицы тем же шрифтом. Каждое примечание должно располагаться с новой строки, помечено надстрочной цифрой, которая отделяется от текста примечания пробелом. В конце каждого примечания ставится точка. Примечания нумеруются в соответствии с их появлением в таблице: сверху вниз и слева направо. Размер каждого рисунка (даже если они 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 указанным выше требованиям по качеству.

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

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

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

Список литературы должен быть кратким и содержать не более 20 ссылок для статей, посвященных экспериментальным и клиническим исследованиям, и не более 100 ссылок для обзорных статей. Номера ссылок указываются 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.

(окончание см. на стр. 36)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 618.11-006.6-037:577.112

*В.Л. Карапетян, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, С.О. Никогосян, В.В. Кузнецов***ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА KI-67
В ТКАНИ ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ I-II СТАДИЙ**
*РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Карапетян Виктория Лазртовна, соискатель отделения онкогинекологии НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-90-40; +7(495)778-93-60**e-mail:** vikakarapetyan@mail.ru

Статья поступила: 15.03.2010, принята к печати 17.06.2010.

Резюме

Лечение больных раком яичников занимает особое место в практической медицине и требует пристального внимания онкологов. В настоящее время наиболее интересным и перспективным направлением в диагностике злокачественных опухолей является определение опухолевых маркеров. Одним из молекулярных параметров, характеризующим биологические свойства злокачественных новообразований, является оценка пролиферативной активности опухоли, в том числе и по индексу Ki-67. Иммуногистохимическим методом в ткани первичной опухоли 48 больных морфологически верифицированными злокачественными эпителиальными новообразованиями яичников было проведено изучение пролиферативной активности по индексу Ki-67. Проанализированы корреляции индекса Ki-67 с клинико-морфологическими особенностями опухоли. Показано, что больные с высоким индексом Ki-67 в первичной опухоли имеют неблагоприятный прогноз общей выживаемости больных эпителиальным раком яичников ранних стадий.

Ключевые слова: эпителиальный рак яичников, пролиферация, прогностический фактор.*V.L. Karapetyan, E.V. Stepanova, A.Yu. Baryshnikov, S.O. Nikogosyan, V.V. Kuznetsov***PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF KI-67 EXPRESSION
IN STAGE I-II OVARIAN CANCER***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Ovarian cancer is a deadliest gynecologic cancer. When ovarian cancer is diagnosed and treated early, intervention is successful. Therefore, a diagnostic test for the early detection of ovarian cancer has clinical value. In this study we focus on the expression of Ki-67 which is a hallmark of tumor proliferative activity. Using immunohistochemical staining, the expression of Ki-67 protein was followed in benign tumor from 48 patients with pathology-confirmed epithelial ovarian cancer. A strong correlation was evident for Ki-67 index with morphological characteristics of tumor. Based on the data obtained, we conclude that Ki-67 index is an independent unfavorable prognostic marker for early stage of epithelial ovarian cancer.

Key words: epithelial ovarian cancer, proliferation, prognostic factor.**Введение**

Лечение больных раком яичников занимает особое место в практической медицине и требует пристального внимания онкологов. По данным МАИР ежегодно в мире регистрируется более 192 000 новых случаев рака яичников и более 114 000 женщин умирают от злокачественных опухолей яичников. В России ежегодно рак яичников выявляют более чем у 11 000 женщин (10,17 на 100 000). Прирост заболеваемости в России за последние 10 лет составил 8,5 % [1].

Рак яичников занимает 4 место в структуре онкологических заболеваний органов женской репродуктивной системы, уступая по частоте раку молочной железы, эндометрия и шейки матки. При этом самое большое количество женщин, заболевших злокачественными опухолями половых органов, умирает от рака яичников (50–65 %)[6]. В структуре злокачественных эпителиальных опухолей яичников серозные, муцинозные, эндометриоидные и низкодифференцированные формы составляют более 85% [4].

По сводным данным популяционных раковых регистров стран Европы, пятилетняя выживаемость больных этой категории не превышает 35 % [2].

Прогноз заболевания зависит от ряда клинических, морфологических, иммунологических и молекулярно-биологических факторов. Ведущими из клинических факторов прогноза являются стадия заболевания, гистологическая форма и степень дифференцировки опухоли [8; 9]. Особое значение для прогноза больных раком яичников имеет стратегия лечения пациенток.

Вместе с тем эпидемиологические исследования показали, что прогноз заболевания в рамках одной и той же стадии и гистологической структуры опухоли при проведении идентичных методов лечения может быть разным. Тем самым продиктован поиск биологических факторов прогноза влияющих на результаты лечения. Одним из наиболее приоритетных направлений является изучение молекулярных и биологических факторов прогноза выживаемости больных раком яичников.

В настоящее время выявлены различные гены, белки и другие соединения, которые рассматриваются в качестве дополнительных прогностических факторов у больных злокачественными опухолями, в том числе и раком яичников. Они обозначены как иммунологические и молекулярно-биологические маркеры. Определение молекулярно-биологических маркеров в ткани опухоли может давать дополнительную информацию о биологическом поведении опухоли: о скорости ее роста, способности к инвазии и метастазированию, устойчивости к химиопрепаратам. Большое внимание уделяется изучению молекулярно-биологических маркеров, характеризующих апоптоз, пролиферацию клетки и ангиогенез [3; 5; 14]. К ним относятся p53, Bcl-2, Bax, FasI, Ki 67, VEGF, Her2/neu и др.

Одним из молекулярных маркеров, характеризующих биологические свойства злокачественных новообразований, является так называемая «пролиферативная активность опухоли», о которой можно судить путем определения степени экспрессии негистонного белка (Ki-67), синтезируемого в ядрах клеток во время поздней G-фазы, фаз S, G₂ и M клеточного цикла. Показано, что этот белок синтезируется не во всех клетках опухолевой ткани, а только у определенной части. Соотношение клеток в процентах, в которых определяется Ki-67 с клетками, не содержащими этого фактора, получило название индекса Ki-67 [17].

Экспрессия Ki-67 при раке яичников выявлена в 98 % случаев. При этом не найдено различий индекса Ki-67 в первичной опухоли и метастазах. Среднее значение индекса пролиферации составило 41,7 и 41 % соответственно [7; 13; 18].

В исследованиях показана более высокая пролиферация Ki-67 при раке яичников в сравнении с доброкачественными и пограничными опухолями. Пролиферативный индекс Ki-67 при разных гистологических формах рака яичников неодинаков. Сообщается о высоком индексе Ki-67 в ткани серозной аденокарциномы (20,1 %). В ткани эндометриоидной аденокарциномы этот показатель составляет 12,2 %. Самый низкий показатель отмечен в ткани муцинозной аденокарциномы – 5,7 % [10–12]. Высокая экспрессия этого белка коррелирует с общей выживаемостью [19]. Имеются сообщения о худшей выживаемости больных при высоком индексе Ki-67 в ткани серозной цистаденокарциномы яичников [15; 16; 20]. Вместе с тем, в литературе нет исчерпывающей информации о клинико-прогностическом значении индекса Ki-67 у больных РЯ, и в частности при I и II стадиях заболевания. Это объясняется разнородностью групп больных и отсутствием многофакторного анализа.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе отделения хирургической онкогинекологии РОНЦ (зав. отделением, профессор, д.м.н. Кузнецов В.В.) совместно с лабораторией НИИ ЭДитО (руководитель лаборатории, профессор, д.м.н. Барышников А.Ю.).

В исследование включены 48 больных морфологически верифицированными злокачественными эпителиальными новообразованиями яичников I–II стадий, которые находились на лечении в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Клинические исследования проведены у всех больных. При этом больные обследовались согласно стандартным методам и алгоритмам диагностики опухоли, а также оценки общего состояния по системе GOG. После полного обследования преступали к выполнению основных этапов комбинированного лечения. Эффективность методов первичного комбинированного лечения, период ремиссии, особенности возврата болезни, результаты химиоте-

рапии II, III и других линий, эффективность промежуточных, повторных операций изучались в процессе динамического наблюдения. У всех больных РЯ I–II стадий методами иммуногистохимии была оценена экспрессия маркера Ki-67. Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов проводили прогревание срезов на водяной бане в предварительно нагретом до 95–99 °C цитратном буфере в течение 30 мин. Затем стекла охлаждали при комнатной температуре в течение 15–20 мин и переносили в фосфатный буфер на 5 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 мин в темноте с 3% перекисью водорода, приготовленной на дистиллированной воде, а затем промывали 5 мин в фосфатном буфере. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 мин с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию с первичными антителами проводили при 4 °C в течение 16 ч. После первичных антител стекла промывали 2 раза по 5 мин в фосфатном буфере. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали DAB+ систему [DAKO]. Реакцию проводили в темноте в течение 5–10 мин. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам.

Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$. Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Для оценки пролиферативной активности опухоли подсчитывали количество Ki-67⁺ опухолевых клеток, приходящихся на 200–300 опухолевых клеток. Индекс Ki-67 определяли по формуле:

$$ПА = \frac{n \cdot Ki - 67^{+} \text{ клеток}}{n_{\text{общее}} \text{ клеток}} \times 100$$

Результаты

Белок Ki-67 выявлен во всех образцах больных эпителиальным РЯ. Из 48 образцов 26 составили таковые больных серозной цистаденокарциномой, 16 – эндометриоидной и 6 – муцинозной аденокарциномой яичников. Содержание маркера колебалось от 1 до 90 % положительных опухолевых клеток в образце. Распределение содержания показателя в опухолях больных раком яичников представлено на рис. 1.

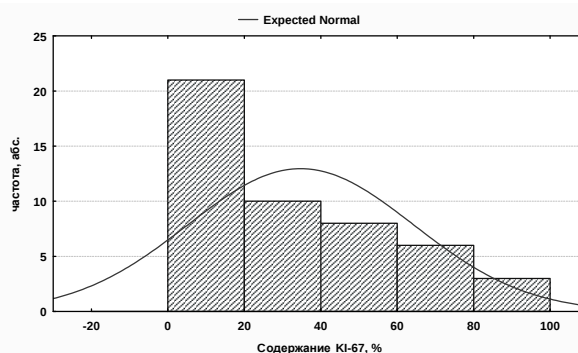


Рис. 1. Распределение содержания Ki-67⁺ клеток в ткани опухоли больных РЯ I–II стадий.

Установлено, что содержание Ki-67⁺ клеток было достоверно выше в клетках серозной цистаденокарциномы – 45% по сравнению с таковым при эндометриоидной и муцинозной аденокарциноме.

При этом содержание маркера было практически одинаковым в клетках как эндометриоидной (12,5 %), так и муцинозной аденокарциномы (12,5 %; $p=0,04$; табл. 1; рис. 2).

Сравнительно высокое содержание Ki-67⁺ клеток обнаружено в ткани опухоли тех больных, которые имели как минимум одни роды в анамнезе ($38,2\pm 5,4$ % по сравнению с $28,6\pm 9,4$ % у нерожавших $p=0,4$).

Содержание Ki-67⁺ клеток в опухоли оказалось выше у больных РЯ I–II стадий, у которых помимо

РЯ имела миоматоз матки ($49,7\pm 7,0$ %, медиана 60 %, $p=0,01$) независимо от гистологического строения новообразования.

При отсутствии миомы матки этот показатель составил всего $27,3\pm 5,1$ % (медиана 15 %, $p=0,01$).

У больных серозной цистаденокарциномой яичников показатель Ki-67 был минимален при высокой степени дифференцировки, а при умеренной и низкой – достоверно выше ($p=0,049$) (табл. 2.).

В группе больных серозной цистаденокарциномой яичников при наличии отягощенного семейного анамнеза степень экспрессии маркера Ki-67 оказалась значительно выше ($60,0\pm 4,7$ %), чем при отсутствии отягощенного анамнеза ($35,2\pm 8,0$ %) у больных (табл. 3.).

Таблица 1

Особенности экспрессии белка Ki-67 в опухоли серозной, эндометриоидной и муцинозной аденокарциномы яичников I–II стадий

Гистологическая форма опухоли	Уровень экспрессии Ki-67 в ткани опухоли		
	Число образцов	Число Ki-67 ⁺ клеток, %	Медиана значения Ki-67, %
Серозная цистаденокарцинома	26	1–90	45
Эндометриоидная аденокарцинома	16	1–60	12,5
Муцинозная аденокарцинома	6	5–90	12,5
ВСЕГО	48	1–90	35
Различия статистически достоверны ($p=0,04$)			

Таблица 2

Особенности экспрессии Ki-67 в опухоли у больных РЯ I–II стадий в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Гистологическая форма опухоли	Степень дифференцировки опухоли	N	Число Ki-67+ опухолевых клеток, %	Медиана Ki-67, %
Серозная цистаденокарцинома	высокая	4	5–10	7,5
	умеренная	8	15–80	50
	низкая	14	1–90	55
Эндометриоидная аденокарцинома	высокая	7	1–60	40
	умеренная	5	5–60	30
	низкая	4	1–10	5,5
Муцинозная аденокарцинома	высокая	5	5–90	5
	умеренная	0	–	–
	низкая	1	*30	–
Все различия недостоверны ($p>0,05$); *абсолютное значение				

Таблица 3

Особенности экспрессии Ki-67 в опухоли у больных РЯ I–II стадий с онкологически отягощенным семейным анамнезом

Гистологическая форма опухоли	Онкологически отягощенный семейный анамнез	N	Число Ki-67+ опухолевых клеток, %	Медиана числа Ki-67+ опухолевых клеток, %
Серозная цистаденокарцинома	Нет	17	1–90	30
	Да	9	40–80	60
Эндометриоидная аденокарцинома	Нет	14	1–60	30
	Да	2	*1,0 и 1,0	–
Муцинозная аденокарцинома	Нет	6	5–90	5
	Да	–	–	–
Различия недостоверны ($p>0,05$); *абсолютные значения				

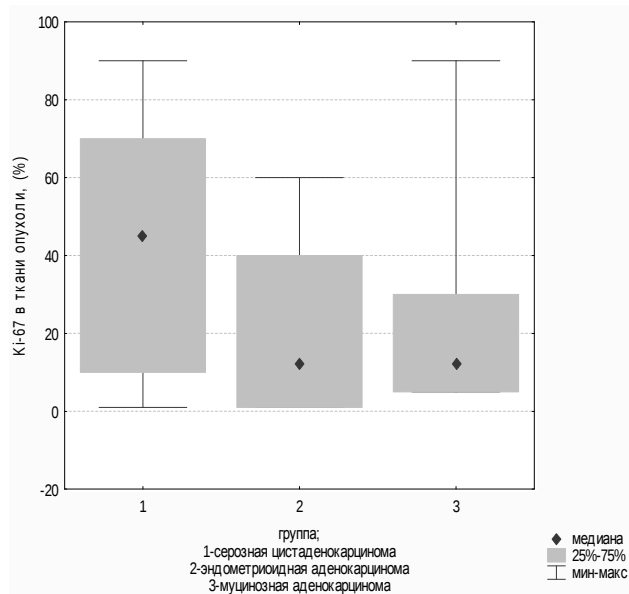


Рис. 2. Уровень экспрессии Ki-67 в ткани опухолей серозной, эндометриоидной и муцинозной аденокарциномой яичников I–II стадий.

Отмечен сравнительно высокий уровень экспрессии Ki-67 у больных с асцитической формой РЯ.

Так, у больных серозной цистаденокарциномой без асцита медиана экспрессии белка Ki-67 равнялась 30 %, а при наличии асцита – 50 %, у больных эндометриоидной аденокарциномой – 5 и 40 % соответственно.

Установлено, что у больных РЯ I–II стадий в смывах из брюшной полости независимо от гистологической формы опухоли медиана экспрессии белка Ki-67 несколько выше, чем при отсутствии таковых (30 % и 10 % соответственно, $p > 0,005$).

Зависимость содержания белка Ki-67 в опухоли в зависимости от стадии заболевания не носит линейный характер, при поздних стадиях заболевания значения маркера были минимальными в группах серозной, эндометриоидной и муцинозной аденокарциномой яичников.

Выявлена достоверная связь между уровнем белка Ki-67 в ткани серозной цистаденокарциномы и возрастом больных. Экспрессия белка Ki-67 в ткани опухоли была сравнительно низкая у больных молодого возраста, более выраженная у лиц в возрасте 62 лет и старше ($r = 0,44$; $p = 0,026$).

В то же время отмечена взаимосвязь между уровнем экспрессии белка Ki-67 и ИМТ у больных эндометриоидной аденокарциномой яичников. Содержание белка Ki-67 в ткани опухоли было выше у больных с низким уровнем ИМТ и, наоборот, ниже при высоком ИМТ ($r = -0,8$; $p = 0,001$).

У больных серозной и муцинозной формами РЯ подобной зависимости не отмечено. У больных серозной цистаденокарциномой выявлена слабая зависимость между содержанием Ki-67⁺ клеток в опухоли и максимальным размером опухоли, которая становилась более очевидной (до значения $r = 0,55$; $p = 0,15$) у перенесших гинекологические операции и при IIc стадии заболевания ($r = 0,7$; $p = 0,052$).

Проведенный нами анализ с целью определения возможной связи между уровнем СА-125 в крови и экспрессией белка Ki-67 в опухоли не установил каких-либо закономерностей у больных серозной цистаденокарциномой ($r = 0$).

У больных эндометриоидной аденокарциномой большим значениям белка Ki-67 соответствовали меньшие значения СА-125. При этом зависимость была недостоверной и отрицательной ($r = -0,38$; $p = 0,17$).

Эта зависимость становилась достоверной при случаях с высокой степенью дифференцировки опухоли ($r = -0,9$; $p = 0,005$).

При умеренной и низкой степени дифференцировки высокий уровень СА-125 сопровождается высокой экспрессией белка Ki-67 ($r = 0,31$; $p = 0,5$).

Для оценки выживаемости больных в зависимости от экспрессии белка Ki-67 всех пациентов разделили на две группы по содержанию белка в опухоли: первая – 50 % и менее, вторая – более 50 %.

Выявлена тенденция снижения отдаленных результатов лечения больных во второй группе ($p = 0,1$). Так, при значениях белка Ki-67 в опухоли от 50 % и более только треть пациенток пережили 10-летний срок, а медиана длительности жизни достигала 5,8 лет, тогда как при Ki-67 менее 50 % общая 10-летняя выживаемость больных РЯ составила 85,7 %.

Оценка безрецидивной выживаемости больных раком яичников I–II стадий по предложенному пороговому значению белка Ki-67 также не выявила значимых различий ($p = 0,4$).

5-летняя БРВ при низких значениях показателя составила $65,1 \pm 10,9$ %, медиана длительности жизни до прогрессирования не достигнута, в группе больных с высокими значениями белка Ki-67 5-летняя БРВ составила – $58,4 \pm 16,3$ %, а медиана – $69 \pm 26,6$ мес.

Заключение

Таким образом, проведенные клинико-молекулярные исследования показали, что экспрессия Ki-67 установлена во всех исследованных образцах независимо от гистологической структуры опухоли, при этом содержание белка Ki-67 было достоверно выше у больных серозной цистаденокарциномой яичников (45 %) и одинаково низким в ткани эндометриоидной (12,5 %) и муцинозной аденокарциномы (12,5 %; $p = 0,04$).

Нами обнаружен ряд закономерностей, в частности, показано, что экспрессия белка Ki-67 коррелирует с возрастом больных серозной цистаденокарциномой ($r = 0,44$; $p = 0,026$).

С увеличением размеров опухоли серозного рака содержание белка Ki-67 пропорционально увеличивалось. Эта тенденция становилась явной у больных со IIc стадией заболевания.

При наличии в смывах клеток рака независимо от гистологической формы опухоли медиана содержания белка Ki-67 в ткани опухоли несколько выше, чем при отсутствии таковых (30 и 10 % соответственно). Значения экспрессии белка достоверно повышались у больных с наличием миомы матки в анамнезе.

При умеренной и низкой степени дифференцировки опухоли высокий уровень СА-125 в сыворотке крови сопровождался повышением экспрессии белка Ki-67.

При значениях белка Ki-67 в опухоли 50 % и более только треть пациенток пережила 10-летний срок наблюдения, тогда как при значениях Ki-67 менее 50 % 10-летний срок наблюдения составил 85,7 %.

Таким образом, высокий индекс Ki-67 в ткани опухоли сопряжен с неблагоприятным прогнозом у больных, особенно серозной цистаденокарциномой яичников, даже при I и II стадиях и может рассматриваться в качестве неблагоприятного фактора прогноза РЯ начальных стадий.

Литература

1. Аксель Е.М., Давыдов М.И. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004 г // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2006. – Том 17, № 3 (прил. 1).
2. Аксель Е.М., Козаченко В.П., Ушакова Т.И. Статистика злокачественных опухолей яичника / Современные экспериментальные и клинические подходы к диагностике и рациональному лечению рака яичников: Сборник статей, приуроченный к ЕШО / под ред. В.А. Горбуновой. – М., 2001. – С. 4–9.
3. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онколог. Журнал. – 1996. – №1. – С. 58–61.
4. Бохман Я.В., Вихляева Е.М., Лившиц М.А. Опухоли яичников: Сборник научных трудов. – Иркутск, 1990. – С. 16–26.
5. Комарова Е.А., Гудков А.В. Супрессия p53: новый подход к преодолению побочных эффектов противоопухолевой терапии (обзор) // Биохимия. – 2000. – 65. – С. 48–56.
6. Урманчеева А.Ф., Мешкова И.Е. Вопросы эпидемиологии и диагностики рака яичников // Практическая онкология. – 2000. – № 4. – С. 7–13.
7. Anttila M., Kosma V., Li H. et al. Clinical significance of catenincjllagen IV, and Ki-67 expression in epithelial ovarian cancer // J. Clin. Oncol. – 1998. – 16. – P. 2591–600.
8. Chan J.K., Tian C., Monk B.J. et al. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer // The Am. J. of cancer. – 2008 – 112(10). – P. 2202–10.
9. Fignon A. Les cancers de l'ovaire // Gyn. J. ds. – 1997. – 370. – P. 21–3.
10. Harlozinca A., Bar J., Sedlakzek P. et al. Expresssion of p53 protein and Ki-67 reactivity in ovarian neoplasms. Correlation with histopathology // Am. J. Clin. Pathol. – 1996. – 105(3). – P. 334–40.
11. Kerner R., Sabo E., Gershoni-Baruch R. et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in ovaries prophylactically removed from Jewish Ashkenazi BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: correlation with histopathology // Gynecol. Oncol. – 2005. – 99(2). – P. 367–75.
12. Khalifeh I., Munkarah A.R., Schimp V. et al. The impact of c-kit and ki-67 expression on patients prognosis in advanced ovarian serous carcinoma // Int. J. Gynecol. Pathol. – 2005 – 24(3). – P. 228–34.
13. Khouja M.H., Baekelandt M., Nesland J.M., Holm R. The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma // Int. J. Gynecol. Pathol. – 2007. – 26(4). – P. 418–25.
14. King L., Okagaki T., Gallup D. et al. Mitotic count nuclear atipia and immunohistochemical determination of Ki-67, c-myc, p-21-ras, c-erbB-2 and p53 expression in granulesa cell tumors of the ovary mitotic count and p53 are indicators of poor prognosis // Gynecol. Oncol. – 1996. – 61(2). – P. 227–32.
15. Köbel M., Kalloger S.E., Boyd N. et al. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies // PLoS Med. – 2008. – 5(12). –P. e232.
16. Korkolopoulou P., Vassilipoulos I., Koustantinidou A.E. et al. The combined valuation of p27 kipl and Ki-67 expression provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients // J. Gynecol. Oncol. – 2002. – 85(3). – P. 404–14.
17. Liu F., Chen J., Liu S. et al. Expresssion and prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in malignant ovarian germ cell tumors // Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei). – 1999. – 62(10). – P. 695–702.
18. Sakai K., Kaku T., Kamura T. et al. Comparison of p53, Ki-67 and CD44v6 expression between primary and matched metastatic lesions in ovarian cancer // Gynecol. Oncol. – 1999. – 72(3). – P. 360–6.
19. Schindlbeck C., Hantschmann P., Zerzer M. et al. Prognostic impact of KI67, p53, human epithelial growth factor receptor 2, topoisomerase IIalpha, epidermal growth factor receptor, and nm23 expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2007. – 17(5). – P. 1047–55.
20. Viale G., Maisonneuve P., Bonoldi E. et al. The combined evaluation of p53 and of Ki-67 (MIB1) labeling index provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients // Ann. Oncol. – 1997. – 8(5). – P. 469–76.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ» (окончание)

При ссылке на главу из книги, написанной коллективом авторов, указывают авторов главы и ее название, затем авторов или редакторов книги, название книги, номер издания (может отсутствовать), место издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы, например:

Кэйн Д. Этические и правовые основы медицинской помощи. Берек Д., Адаши И., Хиллард П. (ред.). Гигиена по Эмилио 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

УДК 616-006.81-085.371:616-006-097

*А.Е. Бармашов, К.Д. Никитин, И.Н. Михайлова, Л.Ф. Морозова, А.Н. Иншаков,
К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников*

**ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА
МЕТОДОМ ELISPOT У БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ВАКЦИНУ «МЕЛАВАК»**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Бармашов Александр Евгеньевич, аспирант лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-10-65

e-mail: alba0686@gmail.com

Статья поступила: 22.07.2010, принята к печати 17.06.2010.

Резюме

В настоящем исследовании изучался иммунологический ответ у онкологических больных, которые получали вакцину «Мелавак». Оценка специфического противоопухолевого иммунитета проводилась методом ELISPOT – одним из основных способов определения количества интерферон-γ-продуцирующих клеток. Лимфоциты инкубировались в присутствии фитогемагглютинаина, опухолевого лизата и без стимулятора. Было установлено, что число нестимулированных клеток, продуцирующих интерферон-γ составило 4,34 на 100 000 мононуклеаров до иммунизации и 5,39 в процессе; в присутствии ФГА: 64,75 и 71,88 соответственно. В присутствии опухолевого лизата обнаружено 6,46 клеток, продуцирующих интерферон-γ на 100 000 мононуклеаров до вакцинации. В процессе иммунизации это число не увеличилось. Полученные результаты позволяют сказать, что вакцина «Мелавак» не стимулирует специфический противоопухолевый иммунитет против меланомы. Однако, поскольку зафиксировано повышение Т-клеточного ответа на ФГА, можно утверждать, что метод ELISPOT применим к оценке специфического противоопухолевого иммунитета.

Ключевые слова: меланома, «Мелавак», ELISPOT, специфический противоопухолевый иммунитет, интерферон-γ.

*A.E. Barmashov, K.D. Nikitin, I.N. Mikhailova, L.F. Morozova, A.N. Inshakov,
K.A. Baryshnikov, L.V. Demidov, A.Yu. Baryshnikov*

**SPECIFIC ANTITUMOR RESPONSE ESTIMATE IN CANCER PATIENTS
BY ELISPOT METHOD TREATED WITH «MELAVAC» VACCINE**
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

Abstract

In this study we have examined the immune response in cancer patients treated with «Melavac» vaccine. Specific antitumor response was estimated by ELISPOT method, one of the basic methods determining the number of interferon-γ-produced cells. Lymphocytes were incubated with phytohaemagglutinin (PHA), tumor lysate or without stimulator. It was determined that the number of non-stimulated cells producing interferon-γ was 4.34 per 100 000 mononuclear cells before immunization and 5.39 after vaccination. When lymphocytes were incubated in presence PHA, the number of cells producing interferon-γ was 64.75 before vaccination and 71.88 after immunisation per 100 000 mononuclear cells. When lymphocytes were incubated with tumor lysate the number of interferon-γ producing cells reached 6.46 per 100 000 mononuclear cells. It is worth to note that the number of mononuclear cells increased during vaccination. The data observed indicate that «Melavac» vaccine does not stimulate the specific antitumor effect in melanoma patients. However, based on the observed increasing of T-cell response in the presence of PHA we conclude that the ELISPOT method is well applied to estimate specific antitumor immunity.

Key words: melanoma, «Melavac», ELISPOT, specific antitumor immunity, interferon-γ.

Введение

В последние десятилетия в области противоопухолевого иммунитета появилось большое число работ, которые наметили пути изменения или восстановления иммунного ответа на опухоль. Одним из таких направлений является противоопухолевая вакциноterapia [1; 5–9]. В качестве вакцины в том числе используют облученные клетки опухоли, как, например, в препарате «Мелавак» [3].

Вакцина «Мелавак» представляет собой клеточную линию меланомы, трансфицированную геном ГМ-КСФ.

Для трансфекции была использована созданная в Институте биологии гена РАН генетическая конструкция на основе вектора pBK-CMV (ClonTech), содержащая кДНК человеческого ГМ-КСФ [2].

Метод ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot) – твердофазная модификация метода иммуноферментного анализа. Изначально ELISpot был разработан С.С. Czerkinsky et al. в 1983 г. [4] для подсчета В-лимфоцитов, продуцирующих специфические антитела, а затем был адаптирован для разных задач, в особенности для идентификации и подсчета цитокин-продуцирующих клеток с точностью вплоть до отдельных клеток. ELISPOT позволяет визуализировать вещество, продуцируемое отдельными активированными клетками, и предоставляет как качественную (тип продуцируемого вещества), так и количественную (число активированных клеток) информацию.

Метод ELISPOT удобен и надежен в оценке иммунного ответа у больных ЗНО, получающих иммунотерапию, в особенности – в условиях нехватки исследуемого материала.

Материалы и методы

Мононуклеары периферической крови получали путем разделения в градиенте плотности фико-колл-урографина ($\rho=1,077$ г/мл) по стандартной методике. Клетки линии mel Kog культивировали в соответствующей полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 10мМ HEPES (Sigma, США), 2мМ L-глутамин (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицина (ICN, США), 0,1% 1000^x раствора аминокислот и 0,1% 1000^x раствора витаминов (ПанЭко, Россия). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня. Для открепления клеток с пластика использовали раствор Версена.

Для получения опухолевого лизата наращивали 150 000 000 клеток линии MelKog и проводили процедуру замораживание-оттаивание 6 раз. Затем поврежденные клетки осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 2 мин. Супернатант стерильно фильтровали через одноразовые поликарбонатные фильтры с низкой сорбцией белка с размером пор 0,22 мкм. Определяли концентрацию белка, развляли по аликвотам и хранили при –20 °С.

Иммунизация больных вакциной «Мелавак» проводилась в дозе 30 000 000. облученных опухолевых клеток с интервалом раз в 2 недели. На разных этапах вакцинации проводился забор крови, условно обозначенный «точка».

При постановке ELISPOT раскапывали порывные МКА к ИФН- γ на белок-связывающую мембрану 96-луночного планшета по 50 мкл на лунку и инкубировали 18 ч при 37 °С и 5 % CO₂. Плато отмывали от несвязавшихся МКА стерильным раствором PBS. Блокировали белок-связывающую мембрану средой, содержащей 5 % ТЭС.

Инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После чего блокирующую среду сливали. В лунки вносили по 5 $\times$ 10⁴ (в присутствии ФГА) и 1 $\times$ 10⁵ (в присутствии лизата и без стимулятора) мононуклеаров в присутствии ФГА, 1 $\times$ 10⁵ мононуклеаров в присутствии лизата. Инкубировали 18 ч при 37 °С и 5 % CO₂. После инкубации 10-кратно отмывали от клеток буферным раствором, содержащим 0,1% Tween 20. Затем, добавляли 100 мкл на лунку биотинилированных МКА к интерферону- γ , разведенные 1:1000 в PBS с 0,5 % BSA и 0,1 % Tween 20, инкубировали 2 ч и отмывали от несвязавшихся АТ.

Затем, добавляли 0,01 %-ную щелочную фосфатазу по 100 мкл на лунку. Инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Плато отмывали и добавляли субстрат к щелочной фосфатазе по 100 мкл на лунку. Плато инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Для остановки реакции плато отмывали проточной дистиллированной водой в течение 2 мин.

Плато высушивали при комнатной температуре в темноте. Количество пятен в лунках определяли на приборе ELISPOT-reader. В качестве опыта использовался лизат опухолевых клеток (из расчета лизат из 10 000 опухолевых клеток на 100 000 лимфоцитов); в качестве положительного контроля – неспецифический активатор лимфоцитов ФГА в концентрации 10 мкг/мл; в качестве отрицательного – клетки без какого-либо стимулятора.

Результаты и обсуждение

Изучалась продукция ИФН- γ лимфоцитами крови 10 больных меланомой, получавших вакцину «Мелавак». Результаты работы представлены в табл.

Число ИФН- γ -продуцирующих клеток только у 1 пациента (больная Л. С. В.) выше в опытной пробе, чем в отрицательном контроле до вакцинации. У 2 больных этот показатель больше в отрицательном контроле, чем в опыте (пациенты Д.В.Ю. и Т.Т.В.) также до иммунизации.

У остальных 7 пациентов число ИФН- γ -продуцирующих клеток было примерно равным в сравниваемых пробах. Результаты говорят о том, что существенной (значимой) разницы между продукцией данного цитокина лимфоцитами, инкубируемыми с опухолевым лизатом, и нестимулированными клетками на данном этапе нет.

Из вышесказанного можно заключить: до вакцинации нет специфического противоопухолевого иммунитета на опухолевый АГ. Подобное явление наблюдается у больных в процессе вакцинации.

Только в 2 из 18 точек (в 11,1 %) у разных больных количество ЛФ, секретирующих ИФН- γ , оказалось выше в опыте, чем в отрицательном контроле. Этот факт может свидетельствовать либо о том, что опухолевый лизат не является иммуногеном, либо специфический иммунитет против клеток меланомы на протяжении вакцинации не активируется.

В процессе вакцинации число клеток секретирующих интерферон- γ в отрицательном контроле либо не изменяется (у одной половины больных), либо уменьшается (у другой половины пациентов). Неспецифический иммунный ответ на ФГА в ряде случаев у одних и тех же больных изменяется на разных этапах вакцинации: либо сначала увеличивается, а потом уменьшается, либо наоборот.

В 2 других случаях (у Д.В.Ю. и Д.А.Ш.) в процессе иммунизации зафиксировано стабильное увеличение ИФН- γ -продуцирующих клеток инкубируемых с ФГА. Также у 2 больных (Т.Т.В., П.М.В.) число ЛФ, секретирующих интерферон- γ , в положительном контроле в процессе вакцинации неуклонно уменьшалось. В опытной пробе в 50 % случаев данный показатель остается неизменным в процессе вакцинации. В 20 % случаев – уменьшается. У одного пациента – увеличивается. В 20 % случаев число ИФН- γ -продуцирующих клеток сначала возрастает, а затем убывает в процессе вакцинации.

Таким образом, нет четкой зависимости в секреции интерферона- γ в указанных пробах на протяжении вакцинации.

При сравнении числа клеток (среднее по всем больным) секретирующих исследуемый цитокин до вакцинации и в процессе вакцинации (было взято максимальное значение в точке у данного пациента) было установлено, что в отрицательном контроле оно составило 4,34 на 100 000 мононуклеаров до вакцинации и 5,39 в процессе вакцинации ($P>0,05$).

В присутствии опухолевого лизата обнаружено 6,46 клеток, продуцирующих ИФН- γ на 100 000 мононуклеаров до вакцинации. В процессе иммунизации это число не увеличивалось ($P>0,05$).

Заключение

Исследование по использованию вакцины «Мелавак» для иммунизации больных меланомой проводилось в рамках I фазы клинических испытаний. На основании полученных результатов можно заключить, что данная вакцина не способствует появлению специфического противоопухолевого иммунитета против клеток меланомы, трансфицированных геном ГМ-КСФ. Данная вакцина была задумана как стимулятор иммунной системы против опухолевых клеток указанного происхождения.

Поскольку, даже в аллогенной системе все клетки данной патологии несут общие антигены, а секретируемый ГМ-КСФ привлекает дендритные клетки, которые и являются ключевым звеном в противоопухолевом иммунитете. Однако опыт показал, что данная модель не индуцирует специфический иммунитет против меланомы. Причина может заключаться в том, что клетки меланомы не несут на своей поверхности молекулы HLA-ABC и HLA-DR, которые необходимы для взаимодействия с лимфоцитами. Тем не менее, было зафиксировано повышение Т-клеточного ответа на ФГА.

Следовательно, метод ELISPOT применим в оценке специфического противоопухолевого иммунитета. Кроме того метод высокочувствителен и позволяет фиксировать секрецию интерферона- γ клетками, количество которых 5×10^4 .

Работа выполнена в рамках государственного контракта Министерства образования и науки Российской Федерации от «14» мая 2009 г. № 02.512.12.2039 в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» на 2007–2012 годы».

Литература

1. Балдуева И.А. Противоопухолевые вакцины // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 157–66.
2. Бережной А.Е., Ларин С.С., Бурова О.С. и др. Получение стабильной линии клеток меланомы человека, секретирующей ГМ-КСФ // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 6–7.
3. Михайлова Л.М., Ермакова Н.П., Меркулова И.Б. Исследование туморогенности противоопухолевой вакцины «Мелавак» // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 60–1.
4. Czerkinsky C.C., Nilsson L.A., Nygren H. et al. A Solid-phase Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells // Journal of Immunological Methods. – 1983. – Vol. 65. – P. 109–21.
5. Lotze M., Dallal R.M., Kirwood J.M., Flickinger J.C. Cutaneous melanoma / Cancer: Principles & Practice of oncology / Eds. V.DeVita, S.Hellman, S.Rosenberg, 6th Ed. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – P. 2012–69.
6. Pardoll D.M. Cancer vaccines // Nat. Med. – 1998. – Vol. 4. – P. 525–31.
7. Parmiani G., Pilla L., Castelli C., Rivoltini L. Vaccination of patients with solid tumours // Ann. Oncol. – 2003. – Vol. 418. – P. 817–24.
8. Rosenberg S. Principles of cancer management: biologic therapy / Cancer: Principles & Practice of Oncology, 5th ed./Eds. V.DeVita, S.Hellman, S.Rosenberg; Chapter 18. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, 1997. – P. 49–373.
9. Rosenberg S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy // Nature. – 2001. – Vol. 411. – P. 380–4.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**

УДК 616-006.81-085.371:616.15-097

Н.В. Голубцова¹, И.Н. Михайлова¹, В.В. Новиков², К.А. Барышников¹, Н.Б. Преснякова², Е.В. Огородникова¹, Н.Н. Петенко³, К.А. Парсункова³, О.С. Бурова¹, Г.З. Чкадуа¹, Л.В. Демидов¹, А.Ю. Барышников¹
ИЗМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ HLA I КЛАССА, АНТИГЕНА CD8 И РАСТВОРИМОГО КОМПЛЕКСА HLA-I-CD8 У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород³ГУП «МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва**Контактная информация:**

Голубцова Наталья Валерьевна, научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)612-96-16

e-mail: ngolubcova@mail.ru

Статья поступила: 20.07.2010, принята к печати 22.07.2010.

Резюме

Исследовано сывороточное содержание растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии дендритными клетками. Полученные данные о нормализации уровня растворимых молекул HLA I класса, понижении уровня CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8 у большинства пациентов позволяют дополнить представления о возможных механизмах реализации иммунного ответа у больных диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии дендритными клетками.

Ключевые слова: растворимые антигены, иммунная система, вакцина, дендритные клетки, меланома.

N.V. Golubzsova¹, I.N. Mikhailova¹, V.V. Novicov², K.A. Baryshnikov¹, N.B. Presniakova², E.V. Ogorodnikova¹, N.N. Petenko³, K.A. Parsunkova³, O.S. Burova¹, G.Z. Chkadua¹, L.V. Demidov¹, A.Yu. Baryshnikov¹

VARIATION FEATURES OF SOLUBLE HLA CLASS I MOLECULES, CD8 ANTIGEN AND SOLUBLE COMPLEX HLA I-CD8 IN PATIENTS WITH DISSEMINATED MELANOMA DURING VACCINOTHERAPY

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod³«Intermedbiophyschem», Moscow**Abstract**

In this study we have examined the content of the soluble molecules HLA class I, CD8 antigen and HLA-I-CD8 complex in serum of patients with disseminated melanoma befor and after dendritic vaccination. We have observed that the level of HLA class I was comparable with the level of HLA class I in healthy donor. However the level of CD8 and HLA-I-CD8 was dramatically reduced. The data obtained increase our knowledge in immune response in patients with disseminated melanoma.

Key words: soluble antigens, immune system, vaccine, dendritic cells, melanoma.

Введение

В настоящее время получено достаточное количество данных о том, что многие поверхностные антигены клеток иммунной системы могут находиться не только в мембранной, но и в растворимой форме, принимая непосредственное участие в реализации иммунного ответа [3; 4; 9; 10]. К белкам, способным регулировать иммунные механизмы и выступать в качестве факторов ухода опухоли от иммунологического надзора относятся растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. Каждая из растворимых дифференцировочных молекул или растворимых молекул гистосовместимости может быть представлена несколькими изоформами, образующимися за счет шеддинга (протеолитического отщепления мембранных белков с поверхности клеток) с мембраны клетки или альтернативного сплайсинга матричной РНК [11]. Они осуществляют множественные функции, модулируя иммунные реакции путем связывания с лигандами своих мембранных гомологов на поверхности клеток, являются межклеточными белковыми коммуникаторами.

Нарушение равновесного содержания растворимых форм мембранных антигенов в межклеточном пространстве и биологических жидкостях организма приводит к модуляции межклеточных мембранных взаимодействий и, соответственно, иммунного ответа. Молекулы HLA I класса (HLA-1) – чрезвычайно важные для осуществления иммунного ответа полиморфные трансмембранные белки, обеспечивающие распознавание иммунной системой чужеродных антигенов и аутоантигенов.

Растворимую форму сывороточного HLA-1 секретируют *in vivo* как Т-, так и В-лимфоциты. CD8 антиген является поверхностным гликопротеином, найденным на мембране большинства цитотоксических Т-лимфоцитов и части натуральных киллеров. Он обеспечивает эффективное взаимодействие клеток при презентации антигенов цитотоксическим Т-лимфоцитам, является корецептором Т-клеточного рецептора и обеспечивает распознавание антигенов, презентиремых в контексте молекул главного комплекса системы гистосовместимости 1 класса. Растворимый CD8 антиген продуцируется активированными CD8-положительными цитотоксическими клетками.

Сывороточный уровень растворимого CD8 антигена служит маркером активации цитотоксических клеток. В то же время, взаимодействуя с молекулами HLA I класса, он тормозит цитотоксическое действие клеток, препятствуя их активации и пролиферации. Сохранение растворимыми сывороточными антигенами способности связывать растворимые гомологи мембранных партнеров подразумевает возможность существования в биологических жидкостях белковых комплексов, например, растворимый ассоциат молекул HLA I класса и CD8 антиген (HLA-I-CD8) [9; 11]. Количественное содержание такого растворимого комплекса изменяется при развитии заболеваний различной этиологии, в частности в области онкогематологии.[5; 11–14].

Одним из направлений в лечении онкологических заболеваний является применение методов вакцинотерапии [2; 6; 7]. Принцип вакцинотерапии основан на индукции противоопухолевого иммунитета после введения в организм опухолевых антигенов. Т-клетки, играющие роль в клеточно-опосредованном иммунитете, распознают аутологичные и аллогенные опухоли с рестрикцией по антигенам главного комплекса гистосовместимости. Одним из постоянных объектов для изучения вакцинотерапии является меланома – опухоль, растущая из меланоцитов, которая считается «антигенной опухолью», экспрессирующей опухолеассоциированные антигены. Специфический клеточный иммунный ответ на меланомные антигены происходит путем узнавания чужеродных пептидов рецепторами Т-клеток посредством молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) дендритных клеток. Изучение путей иммунного ответа у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии является актуальным [2; 8].

Целью настоящей работы явилось исследование сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии дендритными клетками

Материалы и методы

Исследовали образцы сывороток крови больных диссеминированной меланомой (n = 55), которые после хирургического удаления опухоли получали вакцину (в среднем 7 вакцинаций). Забор крови проводился до вакцинации и далее перед каждым введением вакцины (интервалы между вакцинациями – 1 мес.). В качестве контроля использовались сыворотки здоровых доноров (n = 32).

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), нагруженных аутологичным опухолевым лизатом.

Определение уровня растворимых молекул HLA I класса и CD8 антигена проводилось иммуноферментным методом с использованием меченых пероксидазой хрена МКА ИКО-53 и ИКО-31 (НПЦ «Медбиоспектр», Россия) и поликлональных антител, специфичных к мембранным антигенам моноклеарных клеток крови человека, применяемых в качестве «первых» антител для сорбирования в лунки планшетов для иммуноферментного анализа [1].

Для определения растворимых комплексов HLA-I-CD8 в качестве «первых» антител для сорбции использовали МКА ИКО-53 против молекул HLA I класса, в качестве иммуноферментного конъюгата применяли МКА ИКО-31 против CD8 антигена. Учет результатов проводился спектрофотометрически при длине волны 492 нм. Результаты выражали в условных единицах (МЕ/мл).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием методов описательной статистики. Применялся t-критерий Стьюдента; использовались непараметрические методы: U-тест Манна-Уитни (для независимых выборок) и тест Вилкоксона (для зависимых выборок). Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Расчет выживаемости проводили методом Каплана-Мейер. Сравнение двух кривых выживаемости проводили с помощью логранкового критерия. Проведение статистического анализа данных проводилось с помощью пакета программ EXCEL 2003, STATISTICA 6.0 и SPSS 13.0.

Результаты и обсуждение

Первоначально проведенный сравнительный анализ исследуемых показателей свидетельствовал о том, что уровни сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8 у больных диссеминированной меланомой, получавших аутологичную дендритную вакцину, достоверно превышали значения содержания исследуемых растворимых антигенов в сыворотке крови здоровых доноров ($p < 0,05$). По окончании вакцинотерапии дендритными клетками достоверного изменения сывороточного содержания исследуемых растворимых антигенов в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой выявлено не было ($p > 0,05$) (табл. 1).

Показатели уровней сильно варьировали. Значения сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса колебались от 69,0 МЕ/мл до 8008,9 при нормальных значениях в контрольной группе (доноры) $1011,53 \pm 117,8$ МЕ/мл; у антигена CD8, при норме у доноров $377,18 \pm 30,0$ МЕ/мл, максимальное полученное значение равнялось 1793,1, а минимальное – 125,1 МЕ/мл. При норме $513,51 \pm 51,0$ МЕ/мл, значения сывороточного содержания растворимого комплекса HLA-I-CD8 колебались от 74,8 до 1981,4 МЕ/мл. Мы проанализировали полученные результаты и перевели их в относительные в зависимости от нормы (контроль). Сывороточный уровень (СУ) растворимых антигенов рассчитывали по формуле:

$$СУ = \frac{\text{опыт} - \text{контроль}}{\text{контроль}} \times 100\%$$

Полученные показатели представлены в табл. 2

Поскольку в процессе вакцинотерапии сывороточные уровни исследуемых растворимых антигенов у пациентов (n = 55) сильно колебались, они были разделены на 2 группы: 1 – пациенты с изначально повышенным содержанием сывороточного уровня, 2 – больные с пониженным сывороточным содержанием растворимых молекул HLA I класса, антигена CD8 и растворимого комплекса HLA-I-CD8 (табл. 3). В ходе вакцинотерапии у пациентов 1 группы с изначально повышенным ($203,03 \pm 210,6$ %) содержанием сывороточного уровня HLA I наблюдали его снижение к концу лечения на 40 %, причем в течение первых трех вакцинаций уровень еще больше повышался (до 223 %), а затем падал до 165,8 %. Во 2 группе (n = 22) с изначально пониженным содержанием сывороточного уровня растворимой формы молекул HLA I класса ($66,60 \pm 65,1$ %) в конце лечения наблюдалось умеренное повышение до $77,47 \pm 46,4$ % (рис. 1). Был проведен анализ выживаемости пациентов в обеих группах (рис. 2). В группе 1 умерло 54,5% (18 из 33 пациентов), в группе 2 – 72,7% (16 больных из 22) пациентов. Медиана выживаемости составила в группе 1 = $30 \pm 6,2$ мес., в группе 2 – $22 \pm 8,9$ мес. ($p = 0,589$).

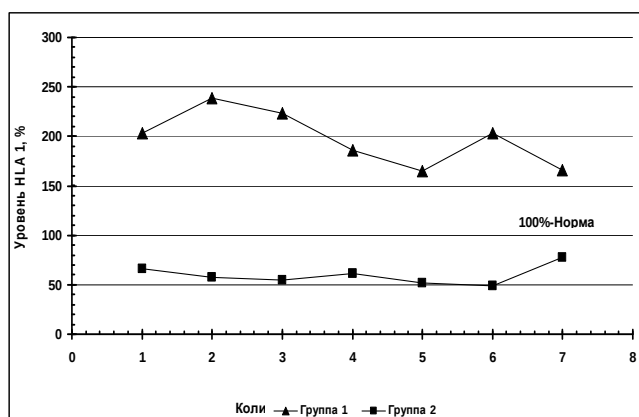


Рис. 1. Изменение содержания уровня растворимой формы молекул HLA I класса в сыворотке у пациентов диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии.

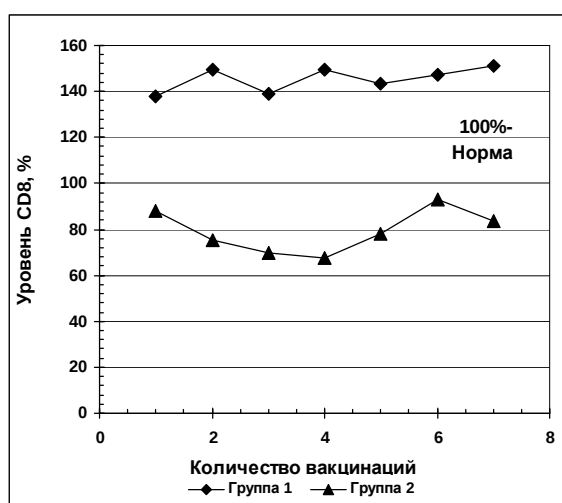


Рис. 3. Изменение содержания в сыворотке уровня растворимой формы антигена CD8 у пациентов диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии.

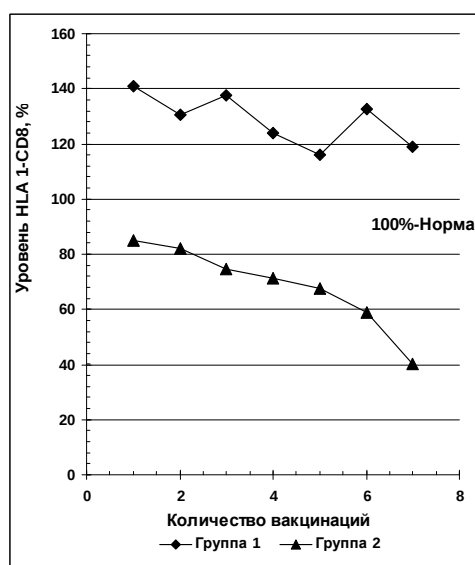


Рис. 5. Изменение содержания в сыворотке уровня растворимого комплекса HLA I-CD8 у пациентов диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии.

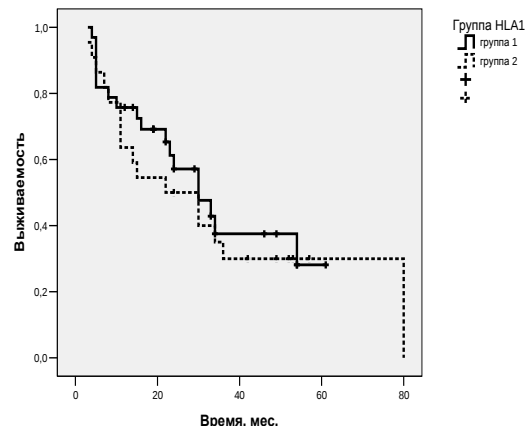


Рис. 2. Выживаемость пациентов диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии в зависимости от начального уровня растворимой формы молекул HLA I класса.

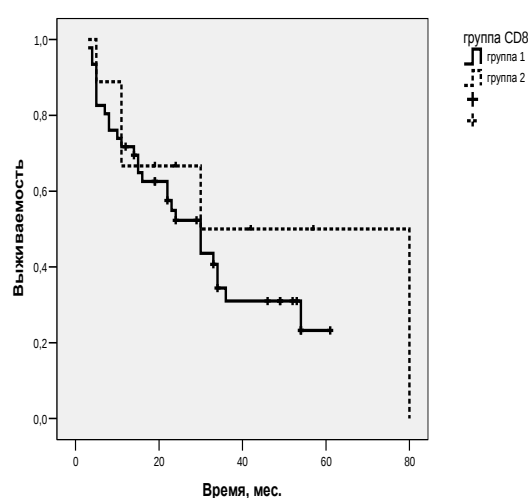


Рис. 4. Выживаемость пациентов диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии в зависимости от начального уровня растворимой формы антигена CD8.

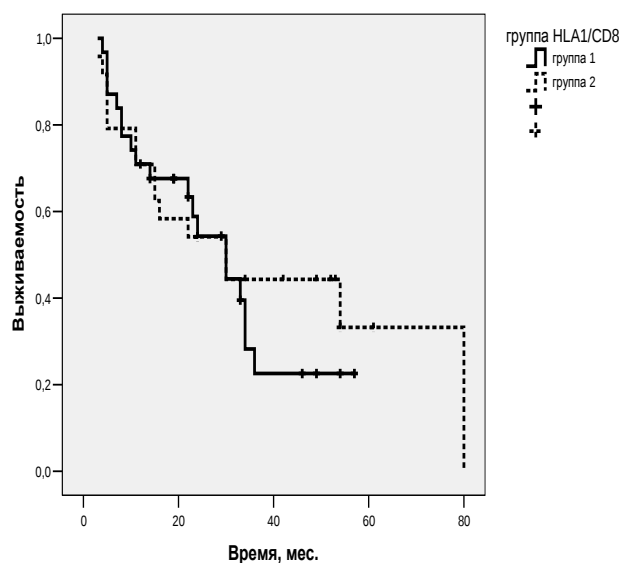


Рис. 6. Выживаемость пациентов диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии в зависимости от начального уровня растворимого комплекса HLA I-CD8.

Таблица 1

Распределение сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса, антигена CD8 и растворимого комплекса HLA-I-CD8 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками ($M \pm m$), МЕ/мл

Антиген	Контрольная группа (доноры) n = 32	Пациенты до лечения n = 55	Пациенты после лечения n = 55
HLA I	1011,53 $\pm$ 117,8	1501,50 $\pm$ 1824,2*	1507,00 $\pm$ 1890,5
CD 8	377,18 $\pm$ 30,0	489,43 $\pm$ 331,0*	474,46 $\pm$ 246,5
HLA-I-CD 8	513,53 $\pm$ 51,0	599,67 $\pm$ 444,4*	532,15 $\pm$ 341,4

*статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

Таблица 2

Относительные показатели сывороточных уровней растворимых молекул HLA I класса, антигена CD8 и растворимого комплекса HLA-I-CD8 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками ($M \pm m$), %

Антиген	Контрольная группа (доноры) n = 32	Пациенты до лечения n = 55	Пациенты после лечения n = 55
HLA I	100,0	148,45 $\pm$ 180,2*	149,84 $\pm$ 186,4
CD 8	100	129,91 $\pm$ 87,4*	126,10 $\pm$ 65,2
HLA-I-CD 8	100	112,34 $\pm$ 80,4*	104,21 $\pm$ 66,46

*статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

Таблица 3

Относительные значения содержания в сыворотке растворимых молекул HLA I класса, антигена CD8 и растворимого комплекса HLA-I-CD8 в группах больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками ($M \pm m$), %

Антиген	Группа 1 (с повышенными значениями)		Группа 2 (с пониженными значениями)	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
HLA I	(n=33) 203,03 $\pm$ 210,6***	(n=33) 165,80 $\pm$ 97,2***	(n=22) 66,60 $\pm$ 65,1***	(n=22) 77,47 $\pm$ 46,4***
CD 8	(n=46) 137,54 $\pm$ 92,36*	(n=46) 131,51 $\pm$ 72,1*	(n=9) 88,0 $\pm$ 38,7	(n=9) 57,25 $\pm$ 8,6*
HLA I-CD 8	(n=31) 141,02 $\pm$ 102,9***	(n=31) 118,94 $\pm$ 55,6**	(n=24) 85,00 $\pm$ 44,9**	(n=24) 40,26 $\pm$ 4,8***

*статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой (доноры) ($p < 0,05$);

**статистически достоверные различия между группами 1 и 2 ($p < 0,05$).

В зависимости от изменения содержания уровня растворимой формы антигена CD8 в образцах сыворотки крови пациентов относительно контроля (содержание у здоровых доноров составило 377,18 $\pm$ 30,0 U/ml), больные были разделены на 2 группы:

- группа 1: пациенты с повышенным содержанием сывороточного уровня растворимой формы антигена CD8 ($n = 46$),
- группа 2: пациенты с незначительно пониженным содержанием уровня ($n = 9$).

В процессе вакцинотерапии у пациентов 1 группы с повышенным содержанием сывороточного уровня изменений к концу лечения выявлено не было. У больных группы 2 ($n = 9$) с незначительно пониженным начальным сывороточным содержанием растворимой формы антигена CD8 отмечено дальнейшее

понижение этого показателя (рис. 3). Не обнаружено статистически значимых различий в выживаемости пациентов в зависимости от изменения содержания уровня растворимой формы антигена CD8 у больных диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии в образцах сыворотки крови пациентов относительно контроля (рис. 4). В группе 1 на момент анализа умерло 63,0 % (29 из 46), в группе 2 – 55,5 % (5 из 9) пациентов. Медиана выживаемости пациентов в 1 группе составила 30 $\pm$ 4,5 мес., в группе 2 – 30 $\pm$ 19,3 мес. ($p=0,346$).

Среднее значение концентрации сывороточного уровня растворимого комплекса HLA-I-CD8 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками у здоровых доноров составило 513,53 $\pm$ 51,0 U/ml.

В зависимости от изменения содержания уровня в образцах сыворотки крови пациентов относительно нормы больные были разделены на 2 группы:

- группа 1: пациенты с изначально повышенным содержанием растворимого комплекса HLA-I-CD8 ($n = 31$),
- группа 2: пациенты с незначительно пониженным содержанием уровня ($n = 24$).

В процессе вакцинотерапии у пациентов 1 группы с изначально повышенными значениями наблюдалось понижение сыровоточного уровня. У пациентов 2 группы с незначительным пониженным содержанием сыровоточного уровня растворимого комплекса HLA-I-CD8 в конце лечения наблюдалось его дальнейшее понижение (рис. 5). Проведенный анализ не выявил статистически значимых различий в выживаемости больных в зависимости от изменения содержания уровня растворимого комплекса HLA I - CD8 в образцах сыворотки крови пациентов в ходе вакцинотерапии относительно контроля (рис. 6). На момент анализа умерло 61,3 % (19 из 31) в группе 1 и 62,5 % (15 из 24) пациентов в группе 2. Медиана выживаемости пациентов в 1 группе составила $30 \pm 4,9$ мес., в группе 2 – $30 \pm 10,4$ мес. ($p=0,578$).

Заключение

Проведенный анализ растворимых антигенов показал, что уровни содержания в сыворотке растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8 у больных диссеминированной меланомой достоверно превышали значения содержания исследуемых растворимых антигенов в сыворотке крови здоровых доноров. При этом все больные, получавшие вакцину, делились на две ограниченные группы (с повышенным уровнем антигенов и пониженным уровнем антигенов) относительно контрольной группы (доноры с нормальными значениями). Установлено, что при вакцинотерапии дендритными клетками наблюдается снижение уровня

растворимых молекул HLA I класса у больных с повышенными значениями и повышение до нормальных значений у больных с пониженным содержанием растворимого сыровоточного HLA I.

Достоверных изменений в содержании растворимых форм CD8 антигена в образцах сыворотки крови пациентов с повышенными показателями выявлено не было, но была отмечена тенденция к понижению сыровоточного содержания в группе с пониженными значениями относительно нормальных значений контрольной группы.

Было выявлено понижение сыровоточного содержания растворимого комплекса HLA-I-CD8 в образцах сыворотки крови больных диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии в обеих группах.

Нами не обнаружено статистически значимых различий в выживаемости больных в зависимости от исходного уровня растворимых антигенов. Изучение сыровоточного содержания растворимых антигенов в образцах сыворотки крови больных диссеминированной меланомой в дальнейшем может помочь в изучении путей иммунного ответа в процессе вакцинотерапии.

Полученные данные о нормализации уровня растворимых молекул HLA I класса, понижении уровня CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8 у большинства пациентов позволяют дополнить представления о возможных механизмах реализации иммунного ответа у больных диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии дендритными клетками.

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

Литература

1. Барышников А.Ю., Тоневский А.Г. Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. – М.: Медицина, 1997. – 212 с.
2. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака. – Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 2004. – Т. 2.
3. Барышников А.Ю. Биотерапия опухолей: неудачи и перспективы // Маммология. – 2007. – №1. – С. 13–6.
4. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадашидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – Т. 1. – С. 6–10.
5. Гостюжова Е.А., Преснякова Н.Б., Волкова С.А., Новиков В.В. Изучение мониторинговой роли сыровоточного пула растворимых дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости при хроническом миелолейкозе // Российский биотерапевтический журнал – Материалы VII Всеросс. Научно-практической конфер. «Отечественные противоопухолевые препараты». – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 60.
6. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Демидов Л.В. Вакцинотерапия меланомы дендритными клетками // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, №3. – С. 8–18.
7. Моисеенко В.М. Возможности вакцинотерапии меланомы кожи // Практическая онкология. – 2001. – Т. 4, № 8. – С. 58–64.
8. Моисеенко В.М., Балдуева И.А. Проблемы иммунологии опухолевого роста и возможности вакцинотерапии // Медицинский академический журнал. – 2007. – Т. 7, № 4. – С. 17–35.
9. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. – 2007. – № 4. – С. 249–53.
10. Новиков В.В., Евсегнеева И.В. Новые дифференцировочные антигены человека, утвержденные на VII Международном воркшопе // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 3–6.
11. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. – М.: изд-во МИА, 2008. – 243 с.
12. Contini P., Zochi M.R., Pierri I. et al. In vivo apoptosis of CD8 (+) lymphocytes in acute myeloid leukemia patients: involvement of soluble HLA-I and Fas ligand // Leukemia. – 2007. – 2. – P. 253–60.
13. Puppo F., et al. Soluble HLA antigens: new roles and uses // Immunol. Today. – 1997. – Vol. 18(4). – P. 54–155.
14. Puppo F., Ghio M., Contini P. et al. Immunoregulatory role of soluble HLA molecules: a new skin for an old subject? // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 1998. – Vol. 46(3). – P. 157–60.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

**ЭНЦИКЛОПЕДИЯ
КЛИНИЧЕСКОЙ
ОНКОЛОГИИ**

**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**

УДК 616-006.81-085.371.015.2

*И.В. Манина, Н.М. Перетолчина, Н.С. Сапрыкина, А.М. Козлов, И.Н. Михайлова, А.Ю. Барышников***ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ
С ПОМОЩЬЮ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН,
СЕКРЕТИРУЮЩИХ GM-CSF***РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Манина Ирина Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(499)612-81-08**e-mail:** ira-bio@yandex.ru

Статья поступила: 01.07.2010, принята к печати 22.07.2010.

Резюме

В работе на экспериментальной модели меланомы проведены доклинические исследования различных подходов к увеличению эффективности терапии опухолей путем сочетания вакцинотерапии, химиотерапии и хирургического удаления первичного опухолевого узла, а также проведен сравнительный анализ терапевтического и профилактического применения противоопухолевых вакцин. На фоне проведения вакцинопрофилактики возможно предотвращение развития опухолевого процесса до 70 %. Сочетание вакцинотерапии и хирургического лечения меланомы увеличивает антиметастатическую активность вакцинации до 43 %. В результате разработки рациональных схем комбинированной терапии можно рассчитывать на расширение терапевтических возможностей лечения опухолевого процесса.

Ключевые слова: меланома, цельноклеточная противоопухолевая секретирующая GM-CSF вакцина, комбинированная терапия.

*I.V. Manina, N.M. Peretolchina, N.S. Saprikina, A.M. Kozlov, I.N. Mikhaylova, A.Yu. Barishnikov***EXPERIMENTAL RESEARCHES
OF CUTANEOUS MELANOMA IMMUNOTHERAPY
BY ANTITUMOR CELL-WHOLE GM-CSF-PRODUCING VACCINES***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Various approaches to increase efficiency of antitumour therapy by a combination of vaccinotherapy, chemotherapy and surgical excision of primary tumoral node, and also the comparative analysis of therapeutic and preventive application of antitumoral vaccines is carried out in melanoma experimental model. It was postulated that preventive vaccination is able to prevent tumour process by 70 %. The combination of vaccinotherapy and surgical treatment of a melanoma increases antimetastatic activity of vaccination by 43 %. We conclude the combine therapy would led to more effective antitumor response.

Key words: melanoma, antitumor cell-whole GM-CSF-produced vaccine, combine therapy.

Введение

На настоящий момент в клинической практике активно разрабатываются и внедряются методы иммунотерапии опухолей, в частности – вакцинотерапия. [1; 5; 8]. Введение инактивированных опухолевых клеток больному сравнимы с введением опухолевых антигенов, так как предполагается, что после инъекции опухолевые клетки будут захвачены антигенпрезентирующими клетками (АПК), процессированы и представлены в виде антигенных пептидов в комплексе с молекулами МНС. В настоящее время в научных центрах мира проходят исследования по применению противоопухолевых вакцин на основе опухолевых клеток [1; 7]. Для генерации более мощного иммунологического ответа опухолевые клетки трансфицируют геном, который кодирует тот или иной цитокин. Наибольшей активностью обладает GM-CSF [1; 3; 7]. Ключевым фактором, обуславливающим иммуногенность GM-CSF-секретирующих вакцин, является способность этого цитокина индуцировать дифференцировку ранних предшественников в направ-

лении наиболее эффективных «профессиональных» АПК – дендритных клеток. Под действием GM-CSF повышается продукция IL-1 и TNF макрофагами и развивается местная воспалительная реакция, в процессе которой происходит активация макрофагов, гранулоцитов и дополнительно привлекаемых в область инъекции NK и NKT-клеток [8]. Опыт клинического применения GM-CSF-секретирующих вакцин из транзитивно трансфицированных аутологичных опухолевых клеток пациентов подтвердил эффективность такого вида иммунотерапии опухолей человека [12]. Позитивные клинические изменения были получены у 25–30 % пациентов с III и IV стадией меланомы, недостаточно отвечающих на предшествующие курсы химиотерапии. В то же время противоопухолевая вакцинация оказалась недостаточно эффективной в качестве самостоятельного средства терапии злокачественных новообразований. [7; 9; 10].

С целью повышения эффективности вакцинотерапии на адекватных экспериментальных моделях *in vivo* апробируются различные методики и режимы иммунотерапии [6; 10; 15].

Применение современных схем комбинированной химиотерапии позволило добиться повышения эффективности лечения, но показатели выживаемости при этом остались без изменений [11]. Внедрение методов иммунотерапии в составе комбинированного лечения способствует увеличению продолжительности ремиссий без необходимости поддерживающей терапии.

Такие препараты как циклофосфамид, доксорубин способны значительно потенцировать противоопухолевый эффект иммунизации [9; 14]. Обоснованием этого считают способность ряда химиопрепаратов, в первую очередь, подавлять регуляторные Т-клетки, удаление которых усиливает иммунный ответ на многие антигены, в том числе опухолевого происхождения.

Комбинация иммунотерапии GM-CSF секретирующими вакцинами с циклофосфамидом и доксорубином с 2003 г. используется в клинической практике [10; 13].

Стойкое излечение после хирургического иссечения первичного очага опухоли на ранних стадиях развития может быть достигнуто у 80–90 % больных. С другой стороны, стандартная операция по удалению локальной инвазивной меланомы кожи не гарантирует больному возможность длительного безрецидивного выживания, под которым понимается отсутствие местного рецидива и отдаленных метастазов.

Для более поздних этапов течения заболевания, как правило, необходимо комбинировать разные виды терапии: иммунотерапию, химиотерапию, хирургическое лечение [2].

Цель работы – на экспериментальной модели меланомы изучить различные подходы к увеличению эффективности терапии опухолей путем сочетания вакцинотерапии, химиотерапии и хирургического удаления первичного опухолевого узла, а также провести сравнительный анализ терапевтического и профилактического применения противоопухолевых вакцин.

Материалы и методы

Исследование выполнено на мышах линии C₅₇Bl₆, самцах массой 22–25 г. (получены из питомника лабораторных животных РАМН «Столбовая») с подкожно трансплантированными клетками экспериментальной меланомы.

Для индукции развития меланомы использовались клетки B16F10 мышей, которые по своему иммунофенотипу наиболее полно воспроизводят модель меланомы человека. Формирующиеся опухоли измеряли дважды в неделю, объем опухоли определяли по формуле:

$$V = D_{\max} \times D_1 \times \left(\frac{D_{\max}}{2}\right), \text{ где}$$

$D_{\max}$ – максимальному диаметру опухоли,

D_1 – диаметр, перпендикулярный максимальному.

Они экспрессируют ряд специфических опухолевых антигенов, и в то же время характеризуются отсутствием или низкой экспрессией молекул МНС. Для вакцинотерапии использовали облученные на источнике γ -излучения Агат-Р с применением ^{60}Co в клинике экспериментальной терапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (в дозе 100 Гр) клетки меланомы B16F10, секретирующий GM-CSF клон BG.

Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли и динамике продолжительности жизни мышей, антимастигматический – по массе и количеству метастатических колоний в легких в соответствии со стандартными методиками. Хирургические операции проводились на фоне гексеналового наркоза (100 мг/кг, однократно, внутривенно).

Результаты и обсуждение

При профилактической вакцинации в режиме монотерапии с последующей трансплантацией клеток экспериментальной меланомы B16F10 показано достоверное увеличение средней продолжительности жизни животных до $53,1 \pm 3,0$ суток ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой ($29,7 \pm 4,0$), а у 70% в группе отмечено полное предотвращение развития опухолевого процесса. Вакцину вводили животным за 7 суток до трансплантации опухолей.

Для индукции опухолей животным трансплантировали подкожно 1×10^6 нетрансфицированных клеток линии F10. При иммунизации каждой мыши вводили подкожно 1×10^6 клеток цельноклеточной вакцины.

Динамика развития опухолевого процесса в типичном эксперименте представлена в табл. 1.

Таблица 1
Частота развития опухоли по отношению к общему количеству мышей в группе

Время наблюдения, сутки	Контроль	Профилактическая вакцинация
7	3/7	2/7
9	6/7	2/7
11	7/7	6/7
14	7/7	4/7
18	7/7	4/7
22	6/6	5/7
25	6/6	3/7
29	5/5	2/7
32	3/3	2/6
37	–	2/6
45	–	1/5
52	–	1/5

В ходе проведения экспериментов выявлено появление инфильтратов на месте введения вакцин. К концу эксперимента у всех животных эти образования на месте введения вакцин рассасывались.

Данный процесс отражает индукцию иммунной реакции на месте введения вакцины по типу ГЗТ и степень ее выраженности. [4].

Для лечения развившегося опухолевого процесса вакцинотерапия в режиме монотерапии не проявила эффекта в отношении ТРО и антимастигматического действия.

Более того, отмечена небольшая стимуляция роста опухолей. В то же время нельзя исключить, что в данном случае мы имеем дело с «ложной» стимуляцией опухолевого роста, обусловленной повышенной ее инфильтрацией иммунных клеток и клеток стромы, гиперпролиферирующих в зоне опухолевого роста.

В пользу этого предположения говорят и данные, представленные в табл. 2, указывающие на одинаковую продолжительность жизни контрольных животных и животных, получавших вакцину.

Таблица 2

Влияние терапевтического применения вакцины на развитие подкожно привитой меланомы B16F10

Воздействие	СПЖ, дни	УПЖ, %	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %	Средняя масса легких, мг	ТРМ, %
Контроль	23,6±3,0	–	6,1±0,8	–	209,4±20,5	-
Вакцинация	24,1±3,5	2 (-0,7÷4,7)	11 ±1,9	(+) 80	194,3±35,3	7 (2,0÷12,0)

При комбинированном применении цитостатиков: циклофосфамид, цисплатин, доксорубин, лизомустин (в высоких и низких терапевтических дозах) и противоопухолевой вакцины усиления терапевтического эффекта в отношении первичной опухоли не выявлено. Однако на этом фоне отмечено увеличение средней продолжительности жизни животных с меланомой B16F10. Максимально эффективным оказалось применение ЦФ в дозе 30 мг/кг ежедневно в течение пяти последующих дней до и после вакцинации. Динамика торможения опухолевого процесса в типичном эксперименте с введением ЦФ в дозе 30 мг/кг представлена на рис. 1.

На фоне комбинированного применения вакцины и ЦФ отмечено подавление роста опухоли более, чем на 90 %. На 25 сутки эксперимента, к моменту начала гибели контрольных не леченных животных, торможение роста опухоли составило 73 %. Контрольные животные, не получавшие лечение, прожили 24,9±1,2 дня, а животные, получавшие комбинированное лечение 37,0±5,1 ($p<0,05$), дней (УПЖ – 49 %, 95 %ДИ (39,2÷58,8)). Помимо цитотоксического действия на опухолевые клетки, ЦФ оказывает иммуномодулирующее действие, что выражается в существенном повышении противоопухолевой активности вакцинотерапии.

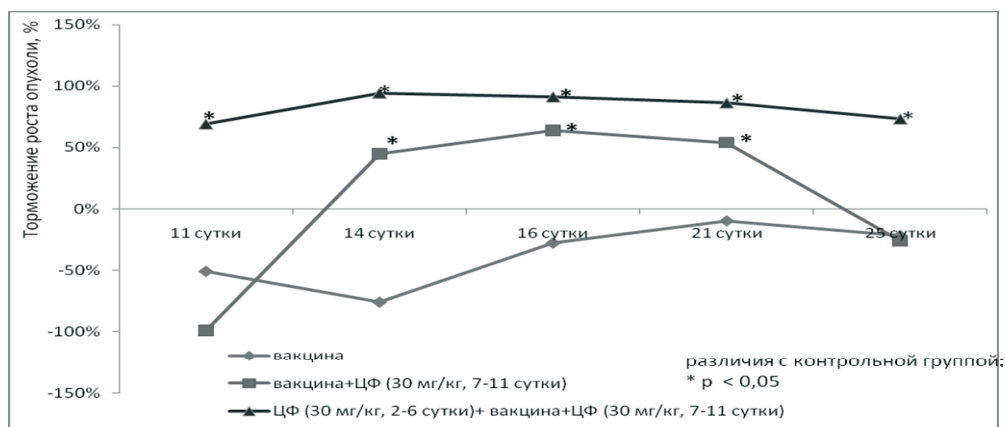


Рис. 1. Торможение роста опухоли в отсроченный период наблюдения при комбинированной терапии: вакцинация и химиотерапия (ЦФ).

На фоне хирургического удаления первичного опухолевого узла вакцинотерапия ингибировала процесс метастазирования меланомы B-16 на 29–43 % (в разных режимах вакцинации).

Наиболее эффективным оказался режим, предполагающий двукратное введение вакцины (до и после хирургического удаления первичного опухолевого узла).

При проведении биотерапии каждой мыши подкожно вводили по 1×10^6 клеток вакцины.

Животным разных групп вакцину вводили до операции (за 5 дней до удаления первичного опухолевого узла), после операции (через 5 дней после операции), а также до и после операции (в те же сроки). Интенсивность метастазирования опухоли у леченных животных на 20–30 % была ниже, чем у контрольных. Сравнительный анализ антиметастатической активности вакцины в разных режимах вакцинации на фоне хирургического удаления первичного опухолевого узла представлен на рис. 2.

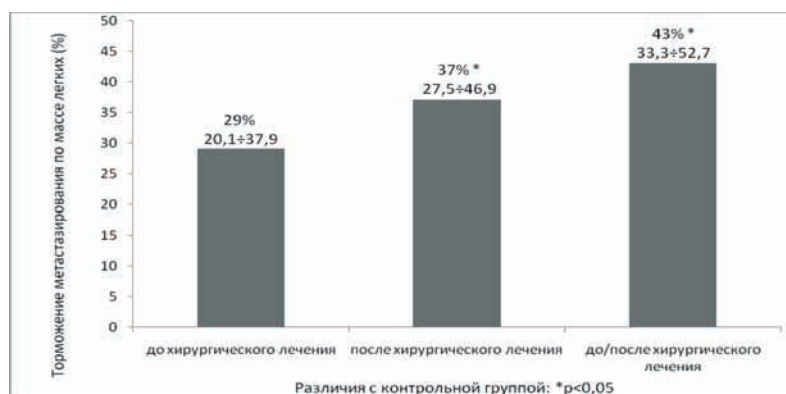


Рис. 2. Антиметастатическая активность цельноклеточной противоопухолевой вакцины (при разных режимах введения) на фоне хирургического удаления.

Выводы

1. С целью эффективного лечебного воздействия на развитие опухолевого процесса целесообразно сочетание различных видов противоопухолевой терапии.
2. Показана возможность применения двух видов противоопухолевых лекарственных средств: противоопухолевой вакцины и цитостатиков, в частности, циклофосфида. В результате разработки рациональных схем их сочетанного применения можно рассчитывать на расширение терапевтических возможностей противоопухолевой терапии.
3. Хирургическое удаление первичного опухолевого узла в сочетании с двукратным введением вакцины оказывает выражен-

- ный антиметастатический эффект. Эти результаты создают предпосылки для оптимизации режимов проведения вакцинотерапии в клинической практике.
4. Высокая профилактическая эффективность противоопухолевой цельноклеточной вакцины GM-CSF-секретирующей вакцины является экспериментальным обоснованием разработки подходов к вакцинации пациентов с меланомой.

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

Литература

1. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. – Т. 2. – С. 59–63.
2. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – Т. 1. – С. 6–10.
3. Бережной А.Е., Сапрыкина Н.С., Ларин С.С. и др. Изучение противоопухолевой активности вакцин на основе генетически модифицированных опухолевых клеток, секретирующих ГМ-КСФ // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 47–53.
4. Михайлова И.Н., Иванов П.В., Петренко Н.Н. и др. Внутрикожная клеточная реакция на фоне вакцинотерапии меланомы кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 63–7.
5. Моисеенко В.М., Балдуева И.А. Проблемы иммунологии опухолевого роста и возможности вакцинотерапии // Медицинский академический журнал. – 2007. – Т. 7, № 4. – С. 17–35.
6. Berinstein N.L. Strategies to enhance the therapeutic activity of cancer vaccines: using melanoma as a model // Ann N Y Acad Sci. – 2009. – 1174. – P. 107–17.
7. Borrello I., Pardoll D. GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience // Cytokine Growth Factor Rev. – 2002. – Vol. 13. – P. 185–93.
8. Dranoff G. GM-CSF-secreting melanoma vaccines // Oncogene. – 2003. – Vol. 22. – P. 3188–92.
9. Emens L.A., Armstrong A., Emens D. et al. A phase I vaccine safety and chemotherapy dose-finding trial of an allogeneic GM-CSF-secreting breast cancer vaccine given in a specifically timed sequence with immunomodulatory doses of cyclophosphamide and doxorubicin // Hum Gene Ther. – 2004. – Vol. 15. – P. 313–37.
10. Hege K.M., Joss K., Pardoll D. GM-CSF gene-modified cancer cell immunotherapies: of mice and men // Int Rev Immunol. – 2006. – Vol. 25. – P. 321–52.
11. Kohlmeyer J., Cron M., Landsberg J. et al. Complete regression of advanced primary and metastatic mouse melanomas following combination chemoimmunotherapy // Cancer Res. – 2009. – 69(15). – P. 6265–74.
12. Li B., Simmons A., Du T. et al. Allogeneic GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapies generate potent anti-tumor responses comparable to autologous tumor cell immunotherapies // Clin Immunol. – 2009. – 133(2). – P. 184–97.
13. Machiels J.P., Reilly R.T., Emens L.A. et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 3689–97.
14. Treisman J., Garlie N. Systemic therapy for cutaneous melanoma // Clin Plast Surg. – 2010. – 37(1). – P. 127–46.
15. Willem W., Overwijk N., Restifo P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma // Curr Protoc Immunol. – 2009. – 20(1). – P. 1–33.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**

УДК 616-006.326:615.277.3.099

О.В. Хугаева¹, Н.П. Яворская¹, И.С. Голубева¹, М.А. Кортава¹, Д.В. Соколова¹, Е.В. Тазина¹, Е.В. Игнатьева¹,
А.П. Полозкова¹, Н.А. Оборотова¹, А.Ю. Барышников¹, И.И. Краснюк²

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МИТОКСАНТРОНА

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ММА им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация:

Хугаева Ольга Вазноевна, лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(495)324-10-65

e-mail: khugaeva_ov@mail.ru

Статья поступила: 21.07.2010, принята к печати 22.07.2010.

Резюме

Проведены сравнительные биологические исследования различных лекарственных форм митоксантрона *in vitro* и *in vivo*. Исследования *in vitro* оказались непоказательными для липосомальной формы митоксантрона, наилучший цитотоксический эффект проявила субстанция. Напротив, проведенные исследования *in vivo* липосомальной формы митоксантрона в сравнении с субстанцией и митоксантроном-ЛЭНС на экспериментальных перевиваемых опухолях мышей Ca-755 и P-388 показали высокий терапевтический эффект. Препараты мышам вводили внутривенно трехкратно с интервалом 96 ч. Показано, что липосомальная лекарственная форма митоксантрона позволяет повысить биодоступность препарата и снизить дозу в 6 раз.

Ключевые слова: митоксантрон, кардиотоксичность, опухоль, липосомальная форма, противоопухолевый эффект.

O.V. Khugaeva, N.P. Yvorskaya, I.S. Golubeva, M.A. Kortava, D.V. Sokolova, E.V. Tazina, E.V. Ignatieva,
A.P. Polozkova, N.A. Oborotova, A.Yu. Baryshnikov, I.I. Krasnuk

ANTITUMOR EFFECT OF VARIOUS DRUG FORMS OF MITOXANTRONE

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

Abstract

In this study we have examined the activity of various drug formulations of mitoxantrone *in vitro* and *in vivo*. Our *in vitro* data indicated that the liposomal mitoxantrone was not as effective as free form of drug. However, *in vivo* animal models Ca-755 and P-388 the effect of liposomal form of mitoxantrone was much more promising in compare with free form of drug. The mitoxantrone formulations were injected into mice at a therapeutic dose regimen with a 96 h interval. The overall results of this study suggest that liposomal mitoxantrone increases the bioavailability of a preparation and reduces the dose for about 6-fold.

Key words: mitoxantrone, cardiotoxicity, tumor, liposomal formulation, antitumor effect.

Введение

Митоксантрона гидрохлорид – современный противоопухолевый препарат, широко применяемый в онкологической практике при острых нелимфобластных лейкозах у взрослых, распространенном раке молочной железы, злокачественных лимфомах, первичном печеночно-клеточном раке, гормонально-резистентном раке предстательной железы с болевым синдромом, раке яичников. Митоксантрон является синтетическим аналогом антрациклиновых антибиотиков, наиболее эффективных цитостатических препаратов – интеркалаторов [4]. Препарат обладает сходной с антрациклинами терапевтической активностью, проявляет свойственный им кардиотоксический эффект. Митоксантрона гидрохлорид входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств (Распоряжение Правительства РФ от 30 декабря 2009 г. № 2135-р г. Москва). Качество препарата регламентировано многими зарубежными фармакопеями, в частности, Европейской (Ph.Eur.4), Британской (BP 2002) фармакопеями и фармакопеей США (USP 27) [1].

Кардиотоксичность антрациклинов – один из основных факторов, ограничивающих применение антибиотиков антрациклинового ряда в клинике. Поскольку частота проявления кардиотоксического действия зависит от дозы и резко повышается при высоких кумулятивных дозах, противоопухолевую активность митоксантрона нельзя использовать полностью. В связи с этим включение препарата в липосомы позволяет не только использовать его в полном объеме, но и повысить противоопухолевую активность препарата. Последнее возможно в связи с измененной фармакокинетикой препарата, его меньшим накоплением в сердечной мышце.

Целью нашего исследования было изучить противоопухолевую активность различных лекарственных форм митоксантрона.

Материалы и методы

Биологическую активность трех лекарственных форм митоксантрона изучали *in vitro* на культуре клеток линии Raji и *in vivo* на перевиваемых опухолях мышей: аденокарциноме молочной железы Ca-755 и лимфолейкозе P-388.

Для оценки цитотоксического действия препаратов использовали МТТ-тест выживаемости клеток (Mosmann T., 1983).

Клетки в концентрации 5×10^4 клеток/мл засевали в 96-луночные круглодонные планшеты и инкубировали с препаратами 72 ч. За 5 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (концентрация 5 мг/мл, Sigma, США). По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием планшетов при 1000 об/мин в течение 4–5 мин. Супернатант осторожно отбирали и вносили в каждую лунку по 200 мкл ДМСО (Sigma, США), клетки ресуспендировали и инкубировали 10 мин при 37 °С, после чего немедленно определяли оптическую плотность раствора формазана в спектрофотометре Titerteck Multiscan MCC/340 (Flow Lab., США) при λ 530 нм.

Противоопухолевую активность проводили на перевиваемых опухолях мышей: аденокарциноме молочной железы Ca-755 и лимфолейкозе Р-388.

В опытах *in vivo* использовали мышей-гибридов линии BDF1 самок массой 18–21 г. Сформированные группы животных содержались в условиях вивария РОНЦ на стандартном рационе брикетированных экструдированных кормов со свободным доступом к питьевой воде.

Для опыта с опухолью Ca-755 использовали 7 групп мышей-гибридов, самок линии BDF1. Животным первых трех групп вводили препараты в трех формах митоксантрона в дозе 3,1 мг/кг трехкратно с интервалом в 96 ч, которая является средней терапевтической дозой для митоксантрона, животным других трех групп вводили препараты в дозе 0,52 мг/кг, составляющей 1/6 часть от средней терапевтической дозы в таком же режиме. Седьмая группа животных была контрольной. Препараты вводили внутривенно.

Критерии оценки противоопухолевой эффективности трех форм митоксантрона: процент торможения роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни животных (УПЖ, %) по отношению к контрольной группе.

Исследования противоопухолевой эффективности на модели опухоли мышей Р-388 проводили с липосомальной формой митоксантрона и с субстанцией митоксантрона гидрохлорида. В опытах использовали 9 групп мышей, по 8 животных в каждой группе. Животным первых пяти групп вводили липосомальный митоксантрон в дозах: 3,1 мг/кг; 1,6 мг/кг; 0,8 мг/кг; 0,52 мг/кг; 0,31 мг/кг соответственно. Животным остальных трех групп вводили субстанцию в следующих дозах: 1,6 мг/кг; 0,8 мг/кг; 0,52 мг/кг соответственно. Последняя группа была контрольной. Критериями оценки противоопухолевой эффективности являлись также СПЖ и УПЖ.

Оценку противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни проводили по окончании опыта и гибели всех животных. Определяли СПЖ_{дни} в группе и вычисляли показатель УПЖ по формуле:

$$УПЖ = \frac{СПЖ_{опыт} - СПЖ_{контроль}}{СПЖ_{контроль}} \times 100\%$$

Также проводили оценку противоопухолевого эффекта по ТРО. Проводили определение 3 размеров опухоли у каждого животного в группе, после чего вычисляли объем (V) опухоли по формулам:

$$V = a \times b \times c, \text{ где}$$

a, b и c – длина, ширина и высота опухолевого узла.

Затем вычисляли V ср.

Степень ТРО вычисляли по формуле:

$$ТРО = \frac{V_{контроль} - V_{опыт}}{V_{контроль}} \times 100\%, \text{ где}$$

V – средний объем опухоли (мм³) в подопытной и контрольной группах, соответственно, на конкретный срок.

Результаты и обсуждение

На начальной стадии работы мы проводили цитостатические исследования *in vitro* липосомальной формы митоксантрона в сравнении с субстанцией митоксантрона гидрохлорида и митоксантроном-ЛЭНС на клеточной линии Raji (Лимфома Беркитта).

На рис. 1 представлены результаты цитотоксического действия на основе МТТ-теста липосомальной формы митоксантрона в сравнении со свободным митоксантроном и препаратом, который в настоящее время используется в клинической практике и производится в виде концентрата для приготовления растворов для инъекций митоксантроном-ЛЭНС.

Как видно из представленного графика, наилучший цитотоксический эффект проявила субстанция. Данный результат был ожидаемым и объясняется тем, что пространственно стабилизированные липосомы имеют на своей поверхности защитный слой из производной полиэтиленгликоля, который приводит к повышению осмотического давления вокруг липосом и препятствует их сближению с клетками [3].

Дальнейшим этапом работы было проведение исследований по изучению противоопухолевой активности различных форм митоксантрона на перевиваемых опухолях мышей: аденокарциноме молочной железы Ca-755 и лимфолейкозе Р-388.

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1 и 2 и на рис. 2 и 3 соответственно. Мы обнаружили высокую противоопухолевую активность у липосомальной формы митоксантрона по сравнению с субстанцией и митоксантроном-ЛЭНС. Происходит это, по-видимому, в результате увеличения времени циркуляции липосом в кровотоке, а также защите препарата от узнавания их белками плазмы крови [2].

По данным табл. 1, мы видим, что ТРО при лечении животных препаратом в липосомальной форме в дозе 3,1 мг/кг достигал 100 %. При введении митоксантрона в той же форме в дозе 0,52 мг/кг, что составляет 1/6 средней терапевтической дозы, наблюдался примерно такой же эффект, как и в дозе 3,1 мг/кг – ТРО 99,8 и 99,7 % с излечением 2 из 8 животных.

Липосомальная форма позволяет увеличить биодоступность митоксантрона в 6 раз, и таким образом, позволяет значительно снизить среднюю терапевтическую дозу. Более того, УПЖ для липосомального митоксантрона в дозе 0,52 мг/мл составило 105 %. На рис. 2 и 3, представленных ниже, можно наблюдать зависимость роста объема опухоли Ca-755 от продолжительности проведения терапии. Более высокая биодоступность и, следовательно, терапевтический эффект подтверждается и при использовании липосомальной лекарственной формы для лечения менее чувствительной экспериментальной модели лимфолейкоза Р-388.

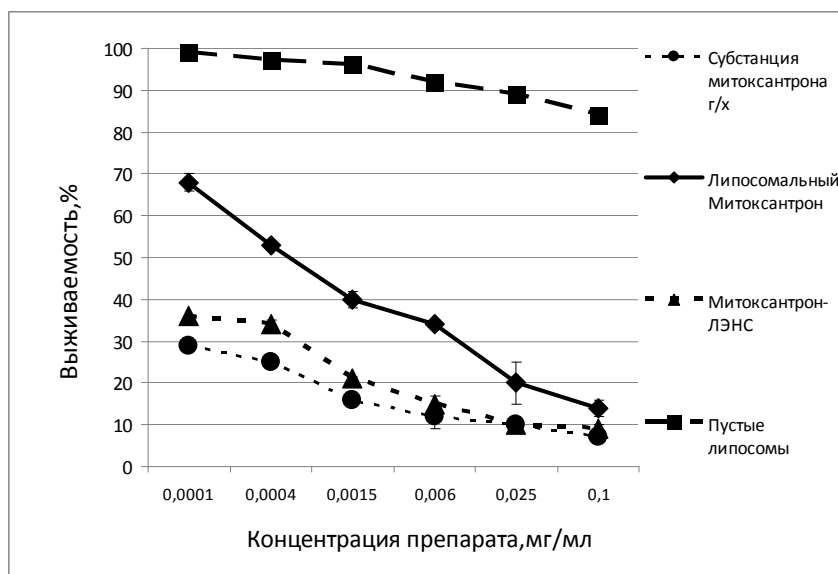


Рис. 1. Цитотоксический эффект различных лекарственных форм митоксантрона на клеточной линии Raji (инкубация 72 ч).

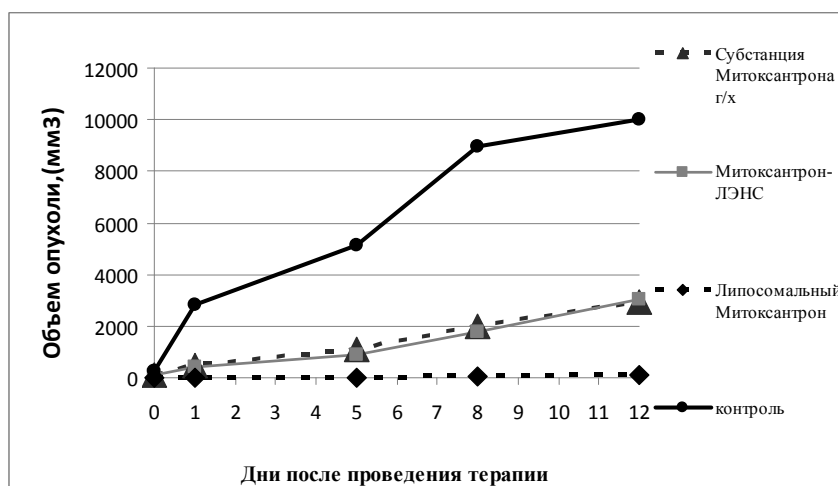


Рис. 2. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм митоксантрона в дозе 3,1 мг/кг на опухоли Ca-755.

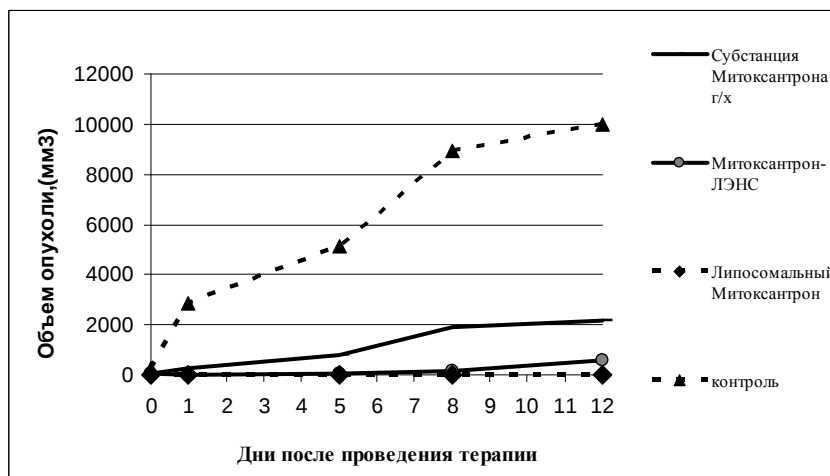


Рис. 3. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм митоксантрона в дозе 0,52 мг/кг на опухоли Ca-755.

Таблица 1

Противоопухолевая активность липосомальной формы митоксантрона в сравнении с митоксантроном–ЛЭНС и прототипом на экспериментальной модели аденокарциномы молочной железы Ca-755

Препарат митоксантрона	Доза мг/кг	ТРО, %						ПЖ	УПЖ
		Дни после проведения терапии							
		2 введение	1	5	8	12	15		
Субстанция	3,1	93,6*	93,3*	87,1*	82,4*	78,4*	79,7*	17–51	28,3
Митоксантрон-ЛЭНС		88,1*	99,5*	99,0*	98,7*	96,5*	94,4*	20–59	91
Липосомальная форма		98,2*	99,92*	100	100	99,94*	99,85*	20–63	61,4
Субстанция	0,52	78	85,3	77,8*	76,8*	58,8	75,5	18–47	44,8
Митоксантрон-ЛЭНС		69,4*	83,7*	82,3*	80*	69,8*	68,2*	15–47	43,9
Липосомальная форма		96,5*	99,5*	99,8*	99,7*	99,1*	97,3*	29–69	105
Контроль		—	—	—	—	—	—	14–34	—

* $p < 0,05$ – по отношению к контрольной группе

Таблица 2

Противоопухолевая активность липосомального митоксантрона в сравнении с субстанцией на экспериментальной модели лимфолейкозе Р-388

Препарат	Доза, мг/кг	ПЖ, дни	УПЖ, %	Количество излеченных животных
Липосомальный митоксантрон	3,1	19–46	209	1
	1,6	24–48	259,1	1
	0,8	24–36	182,7	–
	0,52	19–32	140	–
	0,31	12–23	36,4	–
Митоксантрон субстанция	1,6	27–37	193,6	–
	0,8	22–28	120,9	–
	0,52	14–24	79,1	–
Контроль	–	10–12	–	–

Выводы

1. При исследовании противоопухолевой эффективности трех различных форм митоксантрона на мышцах с опухолью аденокарциномы молочной железы Ca-755 установили, что эффективность липосомальной формы митоксантрона в дозе 0,52 мг/кг составляет от 93–100 % ТРО и превышает противоопухолевое действие субстанции митоксантрона в дозе 3,1 мг/кг (ТРО 78–89 %).
2. Более высокая эффективность липосомальной формы митоксантрона в сравнении с субстанцией подтверждена на экспериментальной модели лимфолейкозе Р-388. УПЖ в дозе 1,6 мг/кг составило 259 и 194 % соответственно и в дозе 0,52 мг/кг – 140 и 79 % соответственно.
3. Удалось снизить дозу митоксантрона в 6 раз, не теряя специфической активности липосомальной формы, и повысить биодоступность препарата.
4. Увеличение продолжительности жизни для липосомального митоксантрона с дозой 0, 52 мг/кг составляло 105 %.

Литература

1. Зембатова С.Е. Стандартизация и контроль качества митоксантрона гидрохлорида: Дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02. – М., 2004. – С. 6.
2. Allen T.M., Hansen C., Martin F. et al. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – Vol. 1066. – P. 29–36.
3. Klivanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L. Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes // FEBS Lett. – 1990. – Vol. 268. – P. 235–8.
4. Martinelli V., Radaelli M.L., Straffi M. et al. Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients // Comi Neurol Sci. – 2009. – Vol. 30 – P. 167–70.

УДК 615.277.3.015.44:616-006-097.1:616-092.4

*Д.В. Соколова, Е.М. Трещалина, Н.В. Андропова, Е.В. Степанова, В.А. Голубева, А.Ю. Барышников***МОДЕЛИ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ *IN VIVO* ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ АНТИГЕНА MUC1***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Соколова Дарина Вадимовна, аспирант лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-10-65**e-mail:** d.v.sokolova@gmail.com

Статья поступила: 21.07.2010, принята к печати 22.07.2010.

Резюме

Одной из мишеней для направленного действия современных «таргетных» противоопухолевых лекарств является антиген MUC1, гиперэкспрессия которого определяет возможность запуска программы клеточной гибели в клетках наиболее распространенных злокачественных опухолей человека, например, рака молочной железы и яичников. Направленная доставка противоопухолевых препаратов с помощью иммунолипосомальных транспортных систем, несущих антитела к этому антигену, представляет собой один из путей реализации таргетной стратегии, направленной на антиген MUC1. Для доклинических исследований таких препаратов нами разработаны две опухолевые модели рака молочной железы T47D и яичников SKOV3 на иммунодефицитных мышах *Balb/c nude*, которые охарактеризованы с помощью иммуноморфологических методов по экспрессии MUC1 и другим терапевтически значимым молекулярным маркерам в зависимости от длительности пассирования на мышах. Установлен стабильный уровень экспрессии антигена MUC1 в обеих моделях на протяжении 5 пассажей, а также высокая ангиогенная активность опухолей, позволяющая выполнять системную терапию. Полученные данные позволяют рекомендовать рак молочной железы T47D и рак яичников SKOV3 в качестве доклинических моделей для изучения специфической противоопухолевой активности иммунолипосомальных препаратов, направленных против антигена MUC1.

Ключевые слова: антиген MUC1, подкожные ксенографты, опухоли человека, иммунодефицитные мыши, иммуноморфология.

*D.V. Sokolova, E.M. Treshalina, N.V. Andronova, E.V. Stepanova, V.A. Golubeva, A.Yu. Barushnikov***DEVELOPMENT OF *IN VIVO* MODELS FOR PRECLINICAL STUDYING OF ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF DRUGS DIRECTED AGAINST MUC-1 ANTIGEN***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

The MUC1 antigen is one of the targets for directed delivery of anticancer drugs. It is long known that overexpression of this antigen participates at the activation of program cell death in most malignant cells including breast cancer and ovarian cancer cells. The directed delivery of immunoliposomal anticancer drugs carrying monoclonal antibodies raised against this antigen is one of the ways to realize the target strategies to MUC1 antigen. We have developed the breast and ovarian cancer models based on transplantation of T47D or SKOV3 cells into immunodeficient mice *Balb/c nude* to examine the effect of anticancer drugs. We have characterized these two models by immunofluorescent staining of MUC1 expression in the experimental animal models. We have also followed the expression of angiogenic markers, depending on the duration of passages in mice. The stable expression of MUC1 antigen in both models was observed in all of 5 passages as well as the high angiogenic activity of tumors. , Based on data obtained, we suggest that these two models allow to perform systemic therapy of tumor and could be recommended to screen anticancer activity of immunoliposomal drugs directed against to MUC1 antigen.

Key words: MUC1 antigen, subcutaneous xenografts, human tumors, immunodeficient mice, immunomorphology.

Введение

Лиганд-опосредованная доставка препарата в опухоль является эффективной стратегией, направленной на повышение его терапевтической активности [8]. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина разрабатываются новые лекарственные иммунолипосомальные формы цитотоксических препаратов, имеющих на поверхности «адресную метку» – МКА к поверхностному опухолевому антигену. Одной из «мишеней» создаваемых иммунолипосомальных препаратов является муциноподобный антиген MUC1 [5]. В норме при дисплазиях и доброкачественных опухолях он локализуется в апикальной части мембраны эпителиальной клетки. При раковом процессе для антигена в основном характерна

выраженная экспрессия по всей мембране и в цитоплазме клеток. Она сохраняется при малигнизации эпителия молочной и щитовидной железы, яичника, матки, легких, пищевода, желудка, толстой и прямой кишки, почки.

Гиперэкспрессия MUC1, как правило, сопровождается плохим прогнозом, что может быть обусловлено антиадгезивными свойствами гликопротеина и активацией метастазирования [1; 5; 6]. Для определения специфического противоопухолевого действия адресных форм противоопухолевых препаратов против антигена MUC1 необходимы адекватные модели на животных с адекватными кинетическими параметрами, а также способностью к неоваскуляризации для обеспечения эффективной доставки препарата к мишени.

В качестве специфической характеристики на поверхности опухолевых клеток обязательна стабильная селективная гиперэкспрессия поверхностных антигенов, к которым специфичны моноклональные антитела, конъюгированные с липосомами [2; 7].

Работа посвящена разработке доклинических опухолевых моделей *in vivo* с помощью MUC1⁺ клеточных линий аденокарциномы яичников SKOV3 и молочной железы T47D для оценки эффективности «таргетных» препаратов, направленных против антигена MUC1.

Материалы и методы

Лабораторные животные

Использовали 50 конвенциональных мышей-самок Balb/c nude 8–10 нед, массой тела 18–21 г разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Мышей содержали в SPF-зоне специализированного кондиционированного отсека лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ ЭДТО РОНЦ при нормированном температурно-влажностном режиме на стерильном экструдированном корме («МЭСТ», РФ), стерильной воде и стерильной бумажной подстилке. Для введения в эксперимент мышей ранжировали по массе тела с разбросом не более 10 % у разных особей (n=3).

Клеточные линии

SKOV3 – аденокарцинома яичников человека; T47D – карцинома молочной железы человека. Клеточные линии получены из банка клеточных культур РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Условия культивирования

Клеточные линии выращивали в полной питательной среде при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста.

Трансплантация ксенографтов

Первый пассаж выполняли из культуры клеток в стандартных прививочных дозах. Для получения 1 пассажа опухоли на мышцах культуры клеток SKOV3 и T47D имплантировали п/к 5×10⁶ клеток на мышшь. Повторные пассажи выполняли взвесью опухолевой ткани (инокулят), полученной из подкожных узлов предшествующего пассажа по 60 мг на мышшь в 0,5 мл питательной среды 199. Взвесь опухоли готовили по стандартной методике, принятой в РОНЦ. Всего выполнено по 5 пассажей с интервалом 15–18 дней. Это позволяло при одном культуральном пассаже получить достаточно опухолевого материала для необходимых исследований.

Определение основных биологических характеристик п/к ксенографтов

В эксперименте выполняли: мониторинг кинетики роста опухолей под кожей мышей и гистологическое исследование строения опухолевых узлов (морфологический контроль), иммунофенотипическое исследование опухоли для верификации экспрессии MUC1 антигена; определение основных маркеров неоангиогенеза в опухоли.

Мониторинг роста п/к ксенографтов на мышцах

Для выявления п/к опухолевых узлов у мышей проводили визуальное наблюдение, а также периодическую пальпацию места имплантации или трансплантации и наблюдение за характером роста в течение

не менее месяца. Пальпируемые узлы многократно измеряли и рассчитывали объем в динамике ($V = a \times b \times c$, мм³), что позволило рассчитать средние объемы (V_{cp}), а также относительную скорость роста опухолевых узлов, как соотношение объемов;

$$\frac{V_n}{V_{n-1}}, \text{ где}$$

n – номер измерения.

По этим параметрам строили кривые и определяли в качестве стандартных показателей роста опухоли длительность латентного периода (отсутствие пальпируемых опухолей), экспоненциальной фазы (≥3-кратное увеличение) и стационарной фазы (отсутствие динамики роста или ≤3-кратное увеличение). Критерии стандартности модели: 100% прививаемость опухоли и продолжительность жизни мышей с опухолью.

Морфологическое исследование

Опухолевый материал фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24–48 ч. Затем промывали в проточной водопроводной воде, фиксировали в 5 сменах этанола по 1–2 ч, в 2 сменах ксилола по 20 мин и в смеси ксилол/парафин 1 ч. Готовые срезы пропитывали парафином в течение 2 ч и заливали в парафин. Депарафинированные срезы толщиной 6–8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. О ПА судили по числу Ki-67-положительных на 200–300 опухолевых клеток. Использовали антитела к Ki-67 [MIB-1] (DAKO). Индекс Ki-67 определяли по формуле:

$$ПА = \frac{n \text{ Ki-67}^+ \text{ клеток} \times 100}{n - \text{общее} - \text{клеток}}$$

Иммунофенотипическое исследование

Опухолевый материал от каждого пассажа типировали с помощью прямой реакции поверхностной иммунофлуоресценции. В исследовании использовали стандартные МКА: CD227 (BD Biosciences), изотипический контроль, конъюгированный с FITC (Beckman Coulter).

Прямая реакция поверхностной иммунофлуоресценции

Клетки (0,5–1×10⁶) дважды отмывали и ресуспендировали в PBS с pH=7,4. Затем инкубировали с МКА в течение 30 мин в темноте при 4 °C. После этого клетки дважды отмывали PBS при pH=7,4 и ресуспендировали в PBS, содержащем 1%-ный формалин. Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Определение основных маркеров неоангиогенеза

Проводили с помощью иммуногистохимического анализа срезов парафиновых блоков опухолей. Ангиогенную активность опухоли определяли как по экспрессии белков, запускающих процесс ангиогенеза HIF-1α и VEGF, лимфангиогенеза – VEGFR-3 (для T47D), так и по количеству микросудов в опухоли. Срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов проводили прогревание срезов в предварительно нагретом до 95–99 °C в 10 mM цитратном буфере в течение 30 мин.

Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 10 мин в темноте с 3% перекисью водорода. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 мин с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию с первичными антителами проводили при 40 °C в течение 16 ч. Использовали антитела к HIF-1α [H1α 67] (Abcam), VEGF [C-1] (Santa Cruz Biotech), VEGFR-3 [AFL4] (BD Pharmingen), CD31 [polyclonal] (Abcam). Инкубацию с проявочной тест-системой [ARK® (Animal Research Kit) Peroxidase или Envision®+kit, DAKO] проводили при комнатной температуре в течение 20 мин, затем срезы промывали 2 раза по 5 мин. Для визуализации ИГХ-реакции использовали DAB+ систему [DAKO]. Реакцию проводили в темноте в течение 5–10 мин. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский балзам. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Nikon» (Япония) под увеличением $\times 20$, $\times 40$. Для маркеров VEGF, VEGFR-3 и HIF-1α оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана) и интенсивность иммунного окрашивания. Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Опухоль считали VEGF⁺ при окрашивании цитоплазмы >25 % опухолевых клеток. Количество сосудов, окрашенных антителами к CD31, оценивали не менее чем в трех полях зрения, содержащих максимальное количество сосудов.

Статистическая обработка данных

Выполняли с использованием компьютерной программы “BIOSTAT” (Version 3.2), Microsoft Excel, Statistica v.5.0. Статистически достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Завершение экспериментов

Мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза в соответствии с международными требованиями этики при работе с лабораторными животными.

Результаты и обсуждение

Мониторинг

кинетики роста п/к ксенографтов SKOV3 in vivo

У 3 мышей, которым трансплантировали по 60 мг опухолевой ткани, подкожные узлы появились к 8 дню (латентный период) после имплантации, $V_{ср} = 131 [78 \div 185] \text{ мм}^3$.

К 15 дню опухоль увеличилась в 3,6 раза, $V_{ср} = 480 [408 \div 554] \text{ мм}^3$ (экспоненциальная фаза). В период с 15 по 30 день установилась стационарная фаза роста (продолжительность 15 дней): на 21 день $V_{ср} = 1439 [1048 \div 1830] \text{ мм}^3$ (увеличение в 2,9 раза), на 30 $V_{ср} = 2643 [1806 \div 3480] \text{ мм}^3$ (увеличение в 1,8 раз; рис. 1).

Выявленная динамика роста SKOV3, имплантированная первично культурой клеток и пассированная трижды на мышах разведения РОНЦ, была идентична результатам мониторинга развития первично трансплантированных подкожных ксенографтов из Коллекции РОНЦ [3; 4].

Гистологическая

характеристика п/к ксенографтов SKOV3 у мышей-самок Balb/c nude (3 пассажа)

Опухоль состоит из сплошного пласта крупных, полиморфных клеток, разделенных узкими прослойками соединительной ткани (рис. 2). Ядра

овально-округлой формы. Редко встречаются железистоподобные структуры. Имеются многочисленные сосуды. Фигуры митоза не многочисленны (2–3 в поле зрения).

Выявлен относительно высокий уровень пролиферативной активности (индекс Ki-67 >50%) (рис. 3).

Иммунофенотипическая

характеристика п/к ксенографтов SKOV-3

В культуре клеток, использованных в качестве инокулята для первого пассажа на мышах, исходно выявлен высокий уровень экспрессии антигена MUC1 $97 \pm 6 \%$ (рис. 4).

На протяжении 5 пассажей уровень экспрессии MUC1 оставался стабильно высоким и составлял соответственно: 1 – 96,8 %, 2 – 89,3 %, 3 – 91,6 %, 4 – 97,0 % и 5 – 92 % (рис. 5 А–Д).

Определение ангиогенной активности п/к ксенографтов SKOV-3

Гипоксия является одним из основных механизмов запуска ангиогенеза в злокачественных опухолях. Происходит активация метаболических путей, регулируемых такими белками, как индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF-1α), что ведет к увеличению экспрессии проангиогенных факторов, включая VEGF. В условиях гипоксии происходит стабилизация белка HIF-1α, что делает возможным его детекцию иммуногистохимическим методом. Наши исследования показали, что значимых различий в накоплении HIF-1α в цитоплазме и ядре опухолевых клеток от пассажа к пассажиру нет. Иммунное окрашивание наблюдалось в 80–100 % опухолевых клеток (рис. 6А). Экспрессия основного фактора ангиогенеза VEGF наблюдалась в цитоплазме 60–70 % опухолевых клеток, интенсивность окрашивания и количество положительных клеток значимо не изменялась на протяжении всего периода пассирования (рис. 6Б). Среднее количество микрососудов в опухоли, выявленных антителами к CD31, составило 4 ± 2 в поле зрения при увеличении $\times 40$ (рис. 6В) и значимо не изменялось от пассажа к пассажиру. Таким образом, стабильно высокая экспрессия факторов неоангиогенеза в п/к ксенографтах SKOV3 на протяжении 5 пассажей указывает на высокую ангиогенную активность этой опухолевой модели.

Мониторинг кинетики роста п/к ксенографтов T47D in vivo

1 пассаж получен имплантацией 1×10^7 клеток T-47D на мыш. К 9 дню (латентный период) получен 100 % выход опухолей, $V_{ср} = 266 [257 \div 275] \text{ мм}^3$. К 15 дню объем увеличился в 3 раза, $V_{ср} = 817 [705 \div 929] \text{ мм}^3$ (экспоненциальная фаза 6 дней). Затем рост опухолей замедлился, и с 15 по 22 день объем опухоли увеличился до $V_{ср} = 1912 [1448 \div 2376] \text{ мм}^3$ (в 2,3 раза). В период 22–30 дней $V_{ср} = 2307 [1551 \div 3063] \text{ мм}^3$ (увеличение в 1,2 раза). Таким образом, стационарная фаза составила 15 дней (рис. 7).

Гистологическая характеристика п/к

ксенографтов T47D у мышей-самок Balb/c nude

Опухоль состоит из сбланных внутрипротоковых пролифератов, разделенных стромой. Протоки выполнены полиморфными клетками с круглыми ядрами (рис. 8). Характерны многочисленные фигуры митоза (2–10 в поле зрения). Строма опухоли рыхлая, хорошо развита. Имеются многочисленные сосуды. Выявляется высокий уровень пролиферативной активности, индекс Ki-67 ~100% (рис. 9).

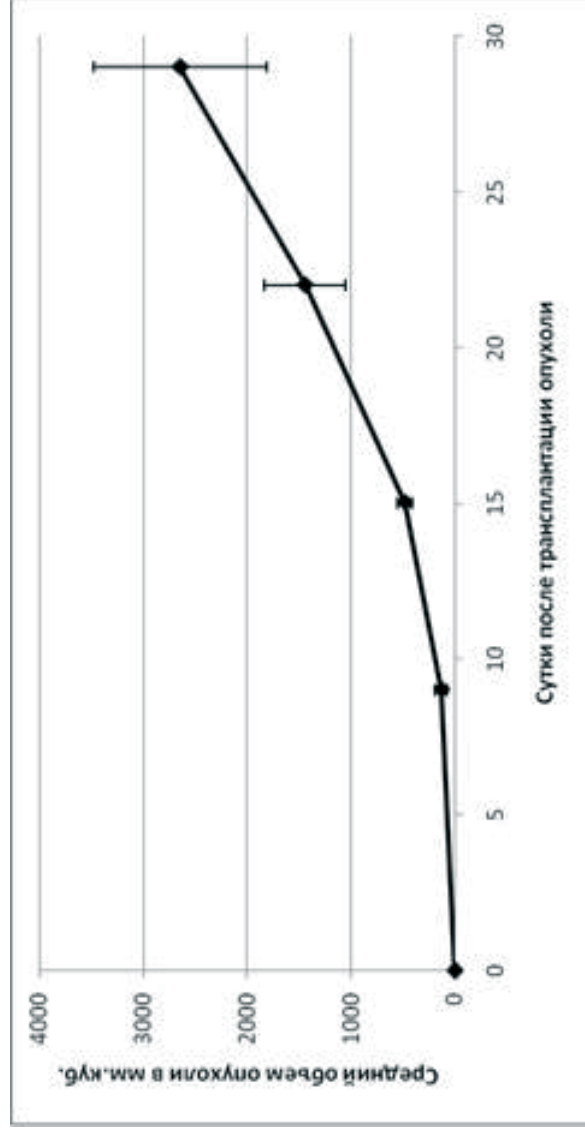


Рис. 1. Динамика роста 3 пассажа п/к ксенографта SKOV3 у мышей-самок Balb/c nude.

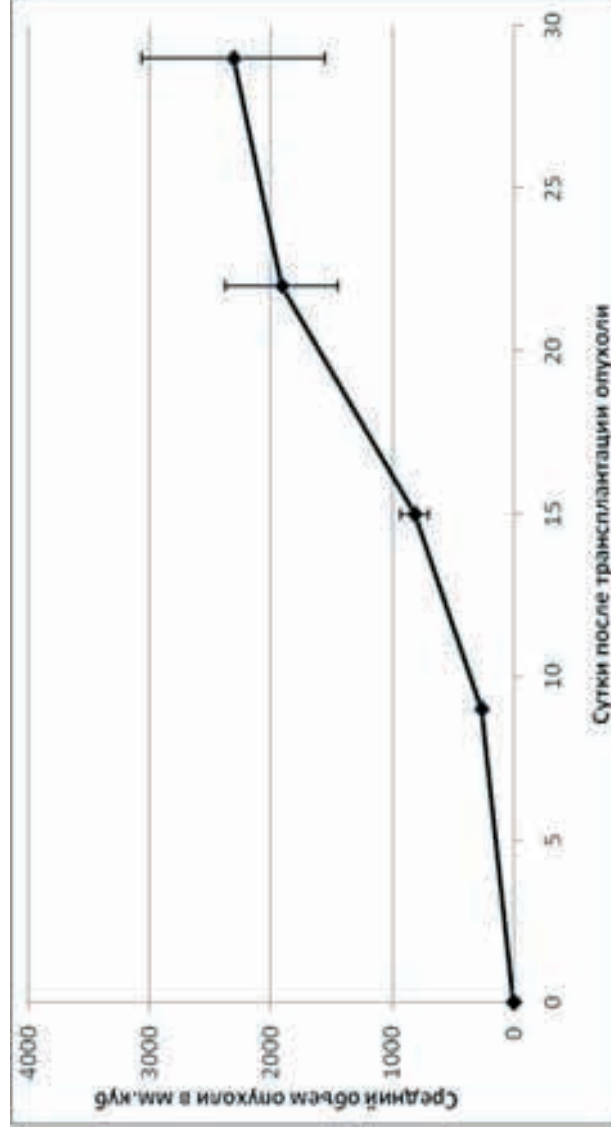


Рис. 7. Динамика роста 1 пассажа п/к ксенографта T47D у мышей-самок Balb/c nude.

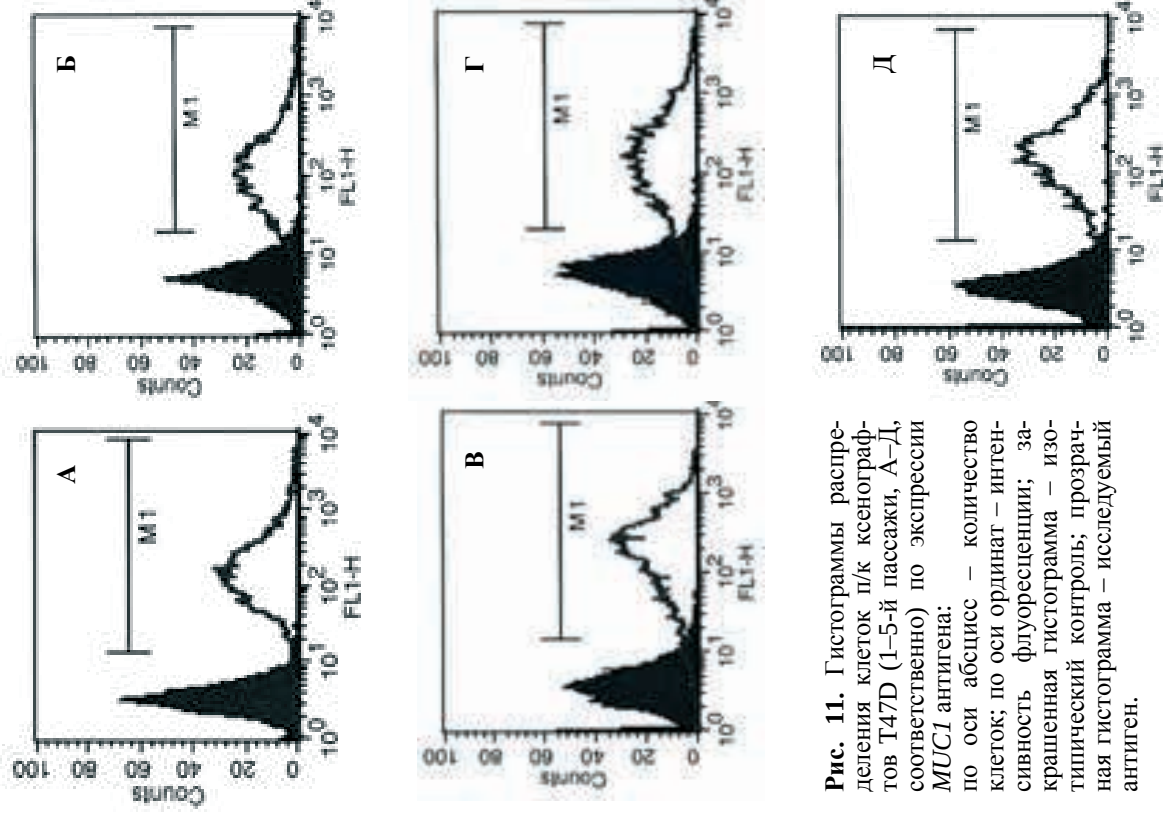


Рис. 11. Гистограммы распределения клеток п/к ксенографтов T47D (1–5-й пассажи, А–Д, соответственно) по экспрессии MUC1 антигена:
по оси абсцисс – количество клеток; по оси ординат – интенсивность флуоресценции; закрашенная гистограмма – изотипический контроль; прозрачная гистограмма – исследуемый антиген.

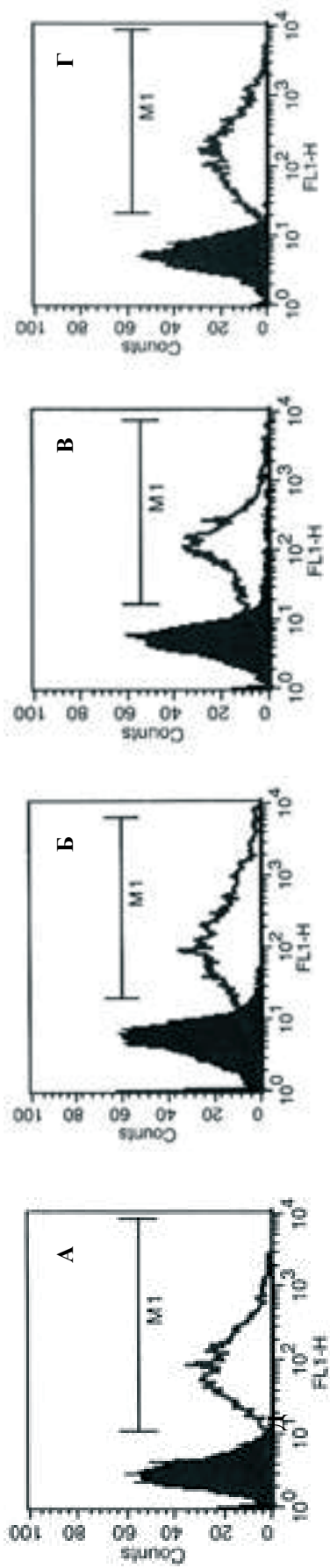


Рис. 5. Гистограммы распределения клеток п/к ксенографтов SKOV-3 (1–5-й пассажы, А–Д соответственно) по экспрессии MUC1 антигена: по оси абсцисс – количество клеток; по оси ординат – интенсивность флуоресценции; закрашенные гистограммы – изотипический контроль; прозрачные гистограммы – исследуемый антиген.

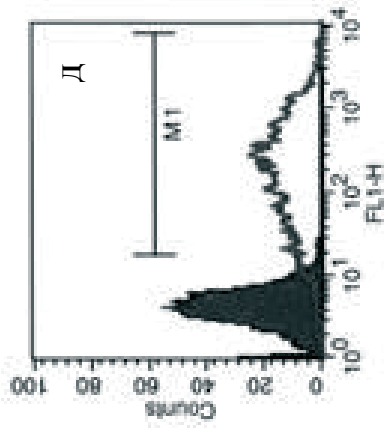


Рис. 4. Гистограммы распределения клеток линии SKOV-3 по экспрессии антигена MUC1: по оси абсцисс – количество клеток; по оси ординат – интенсивность флуоресценции; закрашенная гистограмма – изотипический контроль; прозрачная гистограмма – исследуемый антиген.

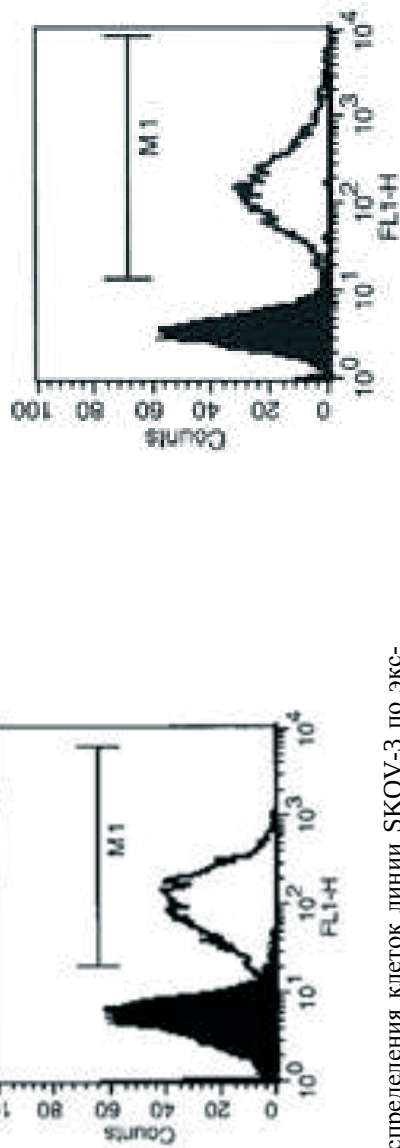


Рис. 10. Гистограммы распределения клеток линии T47D по экспрессии MUC1 антигена: по оси абсцисс – количество клеток; по оси ординат – интенсивность флуоресценции; закрашенная гистограмма – изотипический контроль; прозрачная гистограмма – исследуемый антиген.

Иммунофенотипическая характеристика п/к ксенографтов T47D

В культуре клеток T47D, использованных в качестве инокулята для первого пассажа на мышах, исходно выявлен высокий уровень экспрессии антигена MUC1 98 ± 2 % (рис. 10).

На протяжении всего 5 пассажей уровень экспрессии антигена MUC1 оставался стабильно высоким и составлял соответственно: 1 – 100 %, 2 – 95 %, 3 – 94 %, 4 – 90,8 %, 5 – 98,9 % соответственно (рис. 11 А–Д).

Определение ангиогенной активности п/к ксенографтов T47D

Полученные результаты выявили иммунное окрашивание в 80–100 % опухолевых клеток на протяжении всего периода пассирования.

Интенсивность окрашивания антителами к HIF-1 α была выше в центральной, чем в периферической части опухоли (рис. 12 А).

Экспрессия VEGF была высокой в стромальном компоненте, интенсивность окрашивания значительно не изменялась на протяжении всего периода пассирования (рис. 12 Б).

С помощью антител к VEGFR-3 на всех пассажах выявляется небольшое количество лимфососудов (1–2 в поле зрения) (рис. 12 В). Среднее количество микрососудов в опухоли, окрашенных антителами к CD31, составило 7 ± 2 в поле зрения при увеличении $\times 40$ (рис. 12 Г) и значимо не изменялось от пассажа к пассажи.

Таким образом, стабильно высокая экспрессия факторов неоангиогенеза в п/к ксенографтах T47D на протяжении 5 пассажей позволяет признать данную опухолевую модель высоко ангиогенной.

Выводы

1. Клетки карциномы молочной железы линии T47D адаптированы к росту на иммунодефицитных мышах-самках Balb/c nude разведения РОНЦ в виде подкожных ксенографтов.
2. П/к ксенографты SKOV3 и T47D:
 - в течение 5 пассажей на мышах Balb/c nude имеют стабильно высокий уровень экспрессии антигена MUC1 и пригодны для оценки противоопухолевого действия адресных препаратов, направленных против антигена MUC1;
 - обладают высоким уровнем экспрессии факторов ангиогенеза VEGF, HIF-1 α и CD31, а в случае T47D, также VEGFR-3 и могут быть использованы для доклинического изучения противоопухолевых препаратов, направленных на ингибирование ангиогенеза;
 - на протяжении 5 пассажей имеют стабильную плотность микрососудов, однако опухолевая модель рака молочной железы T47D характеризуется более высокой степенью васкуляризации;
 - по прививаемости, динамике роста и ангиогенезу адекватны задачам доклинического изучения противоопухолевых агентов, предназначенных для системной терапии.

Литература

1. Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю. Моноклональные антитела: путь от разработки до клинического применения. – Под ред. Давыдова М.И., Барышникова А.Ю. – М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – С. 525–7.
2. Соколова Д.В., Степанова Е.В., Голубева В.А. и др. Основные биологические характеристики ксенографтов лимфомы человека ЛБР-2 как мишени для таргетной терапии // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 49–52.
3. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека / Под ред. Давыдова М.И. – М.: Практическая медицина, 2009. – 171 с.
4. Филоненко Д.В., Андропова Н.В., Трещалина Е.М. и др. Разработка моделей для доклинического исследования новых адресных препаратов против HER2/NEU // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 33–9.
5. Feng H., Ghazizadeh M., Konishi H. et al. Expression of MUC1 and MUC2 mucine gene products in human ovarian carcinomas // Jpn. J. Clin. Oncol. – 2002. – Vol. 32(12). – P. 525–9.
6. Moase E.H., Qi W., Ishida T. Anti-MUC-1 immunoliposomal doxorubicin in the treatment of murine models of metastatic breast cancer // Biochimica et Biophysica Acta. – 2001. – Vol. 1510. – P. 43–55.
7. Vingerhoeds M.H., Storm G., Crommelin Daan J.A. Immunoliposomes in vivo // Immunomethods. – 1994. – Vol. 4. – P.259–72.
8. Sapra P., Allen T.M. Improved outcome B-cell lymphoma is treated with combinations of immunoliposomal anticancer drugs targeted to both the CD19 and CD20 epitopes // Clinical Cancer Research. – 2004. – Vol. 10. – P. 2530–7.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**

УДК 618.19-006.6-092.9:615.277.3

*М.Н. Якунина, Я.В. Вишневецкая, Е.М. Трещалина***ТАКСОТЕР И ДОКСОРУБИЦИН В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ДИФфуЗНОГО И ИНФИЛЬТРАТИВНО-ОТЕЧНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СОБАК. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Якунина Марина Николаевна, ветеринарный врач клиники экспериментальной терапии***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-96-29**e-mail:** irsovvet@yandex.ru

Статья поступила: 15.02.2010, принята к печати 17.06.2010.

Резюме

В работе изучена эффективность комбинации таксотера и доксорубицина в предоперационной (неоадьювантной) химиотерапии (НАХТ) неоперабельного рака молочной железы собак. Исследование проведено у 16 собак, из них диффузно-распространенная (ДР) форма определена у 10, и инфильтративно-отечная форма (ИО) – у 6 животных. Химиотерапию проводили таксотером в разовой дозе (РД) 20 мг/м² и доксорубицином в РД 20 мг/м². В группе ДР РМЖ (n=10) объективный эффект (ОЭ) достигнут у 60 % собак, при этом полная ремиссия отмечена у 1 собаки (10 %), частичная ремиссия – у 5 (50 %), стабилизация наблюдалась у 4 (40 %). У всех животных достигнута возможность оперативного удаления опухолевого узла. Выраженный морфологический ответ получен у 1 собаки (10 %), умеренный – у 4 (40 %) и слабый у 5 (50 %). В группе ИО у всех животных наступило прогрессирование процесса. ИО форма РМЖ собак рассматривается как нечувствительная к химиотерапии НАХТ по схеме таксотер+доксорубицин.

Ключевые слова: неоадьювантная химиотерапия, таксотер, доксорубицин, диффузный и инфильтративно-отечный рак молочной железы собак.

*M.N. Yakunina, Ya.V. Vishnevskaya, H.M. Treshalina***TAXOTER AND DOXORUBICIN IN NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY OF DIFFUSIVE OR EDEMATOUS INFILTRATIVE FORM OF BREAST CANCER OF DOGS. THE FIRST DATA***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

In this study we have examined the effect of combined neoadjuvant chemotherapy (Taxoter+Doxorubicin) in treatment of dog with diffuse or edematous infiltrative form of breast cancer. 16 dogs, 10 with diffuse form of breast cancer and 6 with edematous infiltrative form were enrolled in the study. All animals were treated with 20 mg/m² Taxoter and 20 mg/m² Doxorubicin single injection and mastectomy was performed delay 2 weeks. Here we show that Objective Effect was achieved in 60 %, Complete Remission in 10 %, Partial Remission in 50 % and Stabilization in 40 % of cases in group of animals with diffuse tumor. The operability of tumor nodule was obtained in all of dogs. Significant Morphological Response was verified in 10 %, moderate in 40 %, and poor in 40 % of cases. However, the tumor growth progression in all of animals with edematous infiltrative tumor was postulated. Based on the data obtained, we conclude that the edematous infiltrative form of breast cancer is not sensitive to neoadjuvant chemotherapy Taxoter+Doxorubicin.

Key words: neoadjuvant chemotherapy, taxoter, doxorubicin, diffuse or edematous infiltrative form of the dog's breast cancer.

Введение

НАХТ является одним из основных этапов лекарственного лечения неоперабельного РМЖ в онкологической клинике [5; 6]. Основная цель НАХТ – уменьшение размеров и достижение операбельности опухоли за счет циторедукции. Вторая цель – профилактика метастазирования путем воздействия на субклинические микрометастазы для улучшения отдаленного прогноза заболевания [1]. Считается, что циторедуктивный эффект можно получить при НАХТ диффузной формы РМЖ. В онкологической клинике эффективность НАХТ достигает ~60–70 % [1; 5; 6]. Традиционно схемы НАХТ включают один из наиболее эффективных препаратов – доксорубицин (Доксо), что позволяет получить ОЭ в ~70 % случаев с полной морфологической регрессией опухоли в ~10–16 %.

Использование таксанов, в частности – таксотера, в схемах НАХТ, позволяют повысить ОЭ до ~90 % с увеличением числа полных морфологических регрессий опухоли до ~25 % [4; 5; 6].

В ветеринарной практике также существуют проблема неоперабельности РМЖ, которая наиболее важна для собак, у которых заболеваемость достигает 50 % среди всей онкологической патологии, а основным методом лечения является радикальная операция. Наиболее сложны для диагностики и своевременного лечения диффузно-распространенная (маститоподобная) (ДР) и инфильтративно-отечная (ИО) формы РМЖ собак [7; 9]. НАХТ по схеме АС не показала существенного эффекта при ДР форме РМЖ собак [3], а при ИО форме заболевания данные об эффективности лекарственного лечения в этом режиме практически отсутствуют.

Для ответа на эти вопросы нами предпринято изучения НАХТ с таксотером у собак с различными формами РМЖ.

Цель исследования – оценка эффективности комбинированной химиотерапии таксотер + доксорубицин у собак в режиме неoadъювантной химиотерапии при ДР и ИО формах рака молочной железы.

Задачи исследования

- на основании данных клинического обследования отобрать пациентов с ДР и ИО формами РМЖ для НАХТ с таксотером;
- определить эффективность НАХТ по схеме таксотер+доксорубицин на основании клинических данных и морфологической характеристики опухоли при ДР форме РМЖ;
- оценить возможность и эффективность НАХТ по схеме таксотер+доксорубицин при ИО форме РМЖ.

Материалы и методы

Исследование выполнено в Клинике экспериментальной терапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН у 16 собак с ДР и ИО формами спонтанного РМЖ. Средний возраст собак составил 9,6 лет (6–12), 4 собаки (25 %) были стерилизованы и 12 – нестерилизованные. Диагноз поставлен на основании клинического осмотра, цитологического исследования опухоли и подтвержден гистологическим исследованием операционного материала.

Отсутствие метастазов в отдаленных органах определено рентгенологическим и УЗИ-методами обследования органов грудной и брюшной полостей.

Статус неоперабельной опухоли был присвоен на основании размеров первичного опухолевого очага, инвазии в подлежащие ткани и наличия кожных метастазов.

Препараты для НАХТ

Таксотер (доцетаксел, Авентис, Великобритания) использован во флаконах, содержащих по 20 мг действующего вещества. Доксорубицин (Тева, Израиль) использован во флаконах по 10 мг действующего вещества.

В рамках одного цикла лечения препараты вводили последовательно, первым таксотер в РД 20 мг/м² капельно в течение 30 мин в 100 мл физиологического раствора, затем без интервала – доксорубицин (Доксо) в РД 20 мг/м² в 100 мл физ. раствора капельно в течение 30 мин.

Премедикация включала преднизолон в 1,0 мг/кг, супрастин 2%-ный 1,0 мл и церукал 2,0 мл внутримышечно. Всего проведено 2 цикла лечения с интервалом 21 день. Оперативное лечение выполнено 10 из 16 собак. 6 собакам проведена регионарная, а 4 – унилатеральная мастэктомия.

Оценка эффективности лечения проведена с использованием стандартных критериев ВОЗ для солидных опухолей человека [1].

Морфологическая верификация результатов лечения проведена на основании макроскопического и микроскопического исследований операционного материала с учетом качественных и количественных изменений в опухолевой ткани по классификации Лавниковой (1973 г.) [2]:

- I степень (слабый патоморфоз) – заметных изменений в общей структуре опухоли отметить не удается, дистрофия отдельных клеток (> 50 % поврежденных);
- II степень (умеренный патоморфоз) – очаги некроза + дистрофия клеток (50–75 % поврежденных);
- III степень (выраженный) – поля некроза + выраженная дистрофия клеток + единичные атипичные клетки (75–99 % изменений);
- IV степень (резко выраженный) – тотальный некроз (100 % некротически измененных клеток).

Результаты и обсуждение

ДР форма РМЖ определена у 10 собак (62,5 %), ИО – у 6 собак (47,5 %). Для проведения лечения животные поделены на 2 группы соответственно клинической форме роста опухоли:

- группа 1 – «Диффузно-распространенный РМЖ», (n=10);
- группа 2 – «Инфильтративно-отечный РМЖ», (n=6) (табл. 1)

Таблица 1

Характеристика группы пациентов при первичном поступлении и после НАХТ

Характер роста, форма опухоли	п	№	Размеры и подвижность опухолевого очага	
			До лечения	После НАХТ
Первичный, ДР-форма	1	1	7 см, малоподвижная	6 см, подвижна
	1	2	10 см, неподвижна	4,5 см, подвижна
	1	3	10 см, неподвижна	10 см, подвижна
	1	4	15 см, неподвижная, метастазы в легких	4 см, подвижна, метастаз -2 см
	1	5	15 см, подвижна, л/у – 6 см	6 см, подвижна, л/у- 4 см
	1	6	15 см, подвижна	7 см, подвижна
	1	7	15 см, малоподвижная, метастазы в кожу	10 см, подвижная, регрессия кожных метастазов
	1	8	7 см, малоподвижная	7 см, подвижная
Рецидив в операционном шве, форма неизвестна	1	9	до 10 см, спаяна с мягкими тканями	Полная регрессия опухоли
	1	10	8 см, язвенный дефект	3 см, закрытие язвенного дефекта
Первичный, ИО-форма	6	11	опухоль без границ, выражена воспалительная инфильтрация	отек и увеличение опухоли, образование кожных метастазов

- Группа 1 – Диффузно-распространенный РМЖ: ОЭ в группе достигнут у 6 из 10 собак (60 %), при этом ПР отмечена у 1 собаки

(10 %), и ЧР у 5 собак (50 %), СТ наблюдалась у 4 (40 %), прогрессирования заболевания не отмечали – 0 случаев (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность НАХТ с таксотером при лечении собак с диффузно-распространенной формой неоперабельного РМЖ

Показатели эффективности	Число животных	%
Клиническая оценка эффективности		
ОЭ	6	60
ПР	1	10
ЧР	5	50
СТ	4	40
Морфологическая оценка эффективности (лечебный патоморфоз)		
IV – степень	0	0
III – степень	1	10
II – степень	4	40
I – степень	4	40
0	1	10

Макроскопическое обследование показало наличие очагов некроза и лизиса в опухоли (рис. 1). При микроскопическом исследовании операционного материала найдены следующие признаки лечебного патоморфоза: замещение паренхимы опухоли волокнистой грануляционной, соединительной или фиброзной тканью (рис. 2), сопровождающееся отеком и лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 3), макрофагальной реакцией; образование очагов некроза (рис. 4; 5) и некробиоза (рис. 6); наличие разрозненных групп опухолевых клеток (рис. 3), часто с резкими дистрофическими изменениями (рис. 6). В ряде случаев в участках патоморфоза опухоль оставалась в виде раковых эмболов в лимфатических и кровеносных сосудах (рис. 7). На основании использованной нами количественной оценки лечебного патоморфоза по модифицированной классификации Лавниковой полная морфологическая регрессия опухоли не получена, выраженный морфологический ответ получен у 1 собаки (10 %), умеренный – у 4 собак (40 %) и слабый – у 4 из 10 собак (40 %) (см. табл. 2). Полученные в результате НАХТ с таксотером клинически значимая регрессия опухолевого очага и/или существенное уменьшение зоны инвазии при первично-неоперабельной диффузной форме РМЖ позволили всем пациентам выполнить оперативное лечение, т.е. достичь операбельности. У 8 из 10 собак в течение 6 мес. рецидивов или метастатизирования не выявлено. У 2 собак в течение 1–2 мес. после операции развились рецидив и/или кожные метастазы, связанные с опухолевой эмболией мелких локальных лимфатических сосудов в зоне микроокружения опухолевого узла. Учитывая аналогичный феномен у онкологических пациентов, можно считать, что наличие эмболов в зоне опухолевого роста может быть расценено как фактор раннего рецидивирования/метастатизирования и, соответственно, неблагоприятного прогноза для РМЖ собак. Анализ полученных данных показал принципиальную возможность применения НАХТ по схеме таксотер+адриамицин (ТА) для лечения различных форм неоперабельного РМЖ у собак в отличие от схемы АС, неэффективной при данной патологии.

Литература

1. *Переводчикова Н.И.* Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. – М.: Практическая медицина, 2005. – С. 698.
2. *Краевский Н.А.* Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. – М.: Медицина, 1993. – С. 560.
3. *Калишян М.С., Седакова Л.А., Андреева Н.В.* Возможности проведения неоадьювантной полихимиотерапии РМЖ собак с использованием каталитической системы терафтал+аскорбиновая кислота/РБЖ. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 33.
4. *Портной С.М.* Возможности лечения отечно-инфильтративной формы рака молочной железы // Материалы VIII Российского онкологического конгресса. – 2004. – <http://www.rosoncweb.ru>.
5. *Bear H., Anderson S., Brown A. et al.* The Effect on Tumor Response... and Cyclophosphamide: Preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27 // J. Clin. Oncol. – 2003. – 22. – P. 4165–74.
6. *Dieras V., Fumoleau P. et al.* Randomized Parallel Study of Doxorubicin Plus Paclitaxel and... Treatment of Patients With Breast Cancer // J. Clin. Oncol. – 2004. – 15. – P. 4958–65.
7. *Low J., Berman A. et al.* Long-Term Follow-Up for... Multimodality Therapy // J. Clin. Oncol. – 2004. – 15. – P. 4067–70.
8. *Palmeri L., Vaglica M.* Docetaxel in the treatment of metastatic breast cancer // Clin. Risk Manag. – 2008. – 4(5)
9. *Pérez-Alenza M. et al.* First description... of three cases // Breast Cancer Research. – 2004. – 6(4). – P. 300–7.

Общая эффективность НАХТ с таксотером достигает 60 %, что соответствует чувствительности РМЖ человека.

– Группа 2 – Инфильтративно-отечный РМЖ.

Объективного эффекта в группе не получено, во всех случаях отмечено прогрессирование заболевания. Признаками прогрессирования были увеличение объема опухоли и появление кожных метастазов. Соответственно, операбельность не достигнута, поэтому гистологическое исследование материала не проводили.

Таким образом, результаты НАХТ с таксотером, полученные при ИО форме РМЖ собак, идентичны известным данным о низкой результативности этой схемы у онкологических пациентов с этой формой РМЖ. Эта форма отличается высокой агрессивностью и отнесена в группу неблагоприятного прогноза.

Учитывая резистентность к лечению по схеме таксотер+доксорубицин ИО формы неоперабельного РМЖ у собак, для достижения возможности выполнения оперативного лечения при этой форме рака целесообразно апробировать другие схемы химиотерапии, например с гемцитабином, либо отказаться от оперативного лечения.

Выводы

При диффузно-распространенном раке молочной железы собак неоадьювантная химиотерапия по схеме таксотер+доксорубицин позволяет получить объективный противоопухолевый эффект у 60% пациентов при 100% контроле роста опухоли.

Применение НАХТ с таксотером дает возможность в 100% случаев достичь операбельности опухоли при диффузно-распространенном раке молочной железы собак. Инфильтративно-отечная форма рака молочной железы собак не отвечает на неоадьювантную химиотерапию по схеме таксотер+доксорубицин и является признаком неблагоприятного прогноза лечения.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

**ЭНЦИКЛОПЕДИЯ
КЛИНИЧЕСКОЙ
ОНКОЛОГИИ**

**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**

УДК 618.14-006.6-073.43

*М.А. Чекалова, В.В. Кузнецов, М.Н. Колпакова***ВОЗМОЖНОСТИ ТРЕХМЕРНОЙ ЭХОГРАФИИ
В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ТЕЛА МАТКИ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация:***Колпакова Мария Николаевна, канд. мед. наук, врач группы ультразвуковой диагностики отделения амбулаторных методов диагностики и лечения***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-98-45**e-mail:** pups14.07.1980@mail.ru

Статья поступила: 19.02.2010, принята к печати 17.06.2010.

Резюме

В исследовании детально изучены и проанализированы особенности комплексного дооперационного ультразвукового изображения рака эндометрия 90 больных в двух- и трехмерных режимах сканирования. Комплексное ультразвуковое исследование, включающее цветное доплеровское картирование (ЦДК), энергетическое картирование (ЭК), импульсную доплерометрию (ИД), трехмерную эхографию с датчиками стандартной и переменной частот проводилось на ультразвуковом оборудовании экспертного класса. Определены возможности трехмерной эхографии в диагностике местнораспространенного рака тела матки. Оценено значение трехмерной реконструкции изображения для топической диагностики опухоли эндометрия.

Ключевые слова: рак тела матки, трехмерная эхография.*M.A. Chekalova, V.V. Kuznetsov, M.N. Kolpakova***THE OPPORTUNITY OF THREE DIMENTIONAL ECHOGRAPHY
IN COMPLEX DIAGNOSIS OF CORPUS UTERI CARCINOMA***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

In this investigation we have studied the opportunity of presurgical two- and three dimensional scan mode ultrasound diagnosis in 90 patients with endometrium carcinoma. The complex ultrasound diagnosis, including the color Doppler mapping, the energy mapping, the pulse dopplerymetry and three dimensional echography with the use of standard and sweep sensors were carried out based on expert class equipment. We have determined the three dimensional echography characteristics in diagnosis of local corpus uteri carcinoma. We also discuss the significance of three dimensional reconstructive image data in topical diagnosis of endometrium carcinoma.

Key words: corpus uteri carcinoma, three dimensional echography.**Введение**

Рак тела матки – самая частая злокачественная опухоль женских половых органов. За последнее десятилетие отмечается постепенное повышение заболеваемости раком тела матки (РТМ) [5; 7; 8]. Рак тела матки прочно удерживает четвертое место в структуре заболеваемости женщин злокачественными новообразованиями [5].

В результате большого числа исследований по этой проблеме выделен ряд важных критериев, коррелирующих с прогнозом заболевания [1; 4; 16]. Проведение адекватного анализа этих параметров опухолевого процесса необходимо для выработки оптимальной тактики лечения уже на дооперационном этапе обследования.

За последнее десятилетие стандартная эхография превратилась в онкогинекологии в рутинное исследование, которое широко используется клиницистами в качестве метода первичной и уточняющей диагностики.

Что касается уточняющей диагностики, то очевидно, что современная стратегия в онкологии требует все более точной и подробной информации о распространенности опухолевого процесса. В связи с чем, безусловно, актуально использование различных методик, улучшающих ультразвуковую визуализацию [1; 7; 10; 12; 14; 15].

Трехмерное УЗИ в клиническую практику вошло недавно. К его главным преимуществам относят способность получать ультразвуковые срезы, которые недоступны при обычном сканировании, и возможность производить точные измерения объемных образований. Кроме того, это исследование позволяет получать трехмерную анатомическую реконструкцию исследуемых органов [2; 10; 11; 13–15].

По мнению W.P. Martins (2007) и L.T. Merce (2006), объемные величины, установленные с помощью трехмерной эхографии, отличаются более высокой точностью и воспроизводимостью [3; 9; 14; 15].

Помимо ультразвукового исследования в В-режиме этот метод позволяет изучать ход, форму новообразованных сосудов с помощью доплеровских методик, что представляется важным для уточняющей диагностики и разработки прогностических критериев при раке эндометрия. Рядом авторов [6; 7; 12; 15] создается определенное представление о том, что распределение и характер ветвления сосудов, кровоснабжающих быстро растущие опухоли, отличается от обычной сосудистой сети органов, находящихся в нормальном состоянии [6; 7; 10; 14; 15].

Это означает, что оценка характера васкуляризации, вероятно, может способствовать получению дополнительной диагностической информации, которая не учитывается при существующих диагностических методиках.

Цель нашей работы состояла в повышении эффективности уточняющей диагностики рака эндометрия путем изучения возможностей трехмерной эхографии и ультразвуковой ангиографии.

Материалы и методы

В 2005–2008 гг. в поликлинике РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН обследовано 90 больных РТМ. Средний возраст пациенток составил $61,0 \pm 1,5$ года, в состоянии постменопаузы находились более 90 % женщин. Всем пациенткам, обследованным проспективно, производилось комплексное ультразвуковое исследование – т.е. помимо стандартного серошкального исследования, также использовали ЦДК, ЭД, доплерометрию и трехмерную эхографию. При этом у 65 (72,2 %) пациенток был измерен объем опухоли в режиме трехмерной реконструкции.

Комплексное ультразвуковое исследование проводилось на аппаратах экспертного класса Applio (Toshiba), Siemens Antares, оснащенных режимами тканевой гармоник, цветового доплеровского картирования (ЦДК), энергетического картирования (ЭК), импульсной доплерометрии (ИД), трехмерной эхографии с датчиками стандартных и переменной частоты, методиками трансвагинального и трансабдоминального исследования.

Результаты

В процессе исследования нами отмечены преимущества режима 3D: наглядность и возможность трехмерных измерений при использовании сохраненного ультразвукового изображения (рис. 1). Полученное объемное изображение можно было проанализировать сразу или сохранить для последующего изучения. На экран выводились три взаимно перпендикулярные среза, которые были сгенерированы компьютером.

Прежде всего, нас интересовало измерение срединных маточных структур. При этом полученные результаты не показали существенного различия двух-и трехмерной ультразвуковой томографии при определении толщины и объема опухоли. В то же время при использовании трехмерной реконструкции в ряде случаев более четко визуализировался контур опухоли во множестве параллельных срезов, чтобы можно было учесть искажение формы, поскольку полость матки имеет неправильную форму (рис. 2 а, б и рис. 3 а, б).

Как видно на представленных УЗ-томограммах (рис. 2–6), 3D эхография позволяет более наглядно продемонстрировать характер распространения рака эндометрия, локализацию опухоли и ее границы. Подобное объемное изображение достаточно легко читается, на наш взгляд, не только УЗ-специалистами, но и доступно для восприятия клиническим врачам, что может быть использовано ими при планировании операции.

По нашим данным, использование режима 3D позволяет уточнить информацию, полученную при стандартном серошкальном исследовании по поводу локализации и местной распространенности опухоли.

При использовании трехмерной реконструкции более чем в 2 раза чаще в сравнении со стандартным двухмерным исследованием правильно определена локализация опухоли в области дна (табл. 1).

В целом трехмерная эхография позволила уточнить локализацию опухоли в сравнении со стандартным 2D исследованием. Однако достоверные данные нами при этом не были получены (рис. 7).

Еще одно из достоинств рассматриваемой методики – это трехмерная ангиография, при которой улучшается визуализация как крупных, так и мелких сосудистых структур.

Применение трехмерной ангиографии позволило нам оценить пространственное расположение сосудистой сети, получить гораздо более богатую и насыщенную сосудами картину, нежели чем при обычном двухмерном энергетическом картировании (см. рис. 5 и 6).

Практически в половине изученных нами наблюдений в структуре опухоли визуализировалась неоваскуляризация. Анализ визуальной картины патологического кровотока не показал достоверных отличий при сравнении характеристик в зависимости от размеров опухоли.

Вместе с тем, хаотично расположенные цветные локусы визуализировались в опухоли эндометрия при объеме $> 50,0 \text{ см}^3$ больше, чем в половине случаев, в то время, как при небольшом объеме (менее 15 см^3) патологическая васкуляризация определялась крайне редко (рис. 8).

При количественном анализе сосудистой внутриопухолевой перфузии при РТМ было отмечено снижение сосудистого сопротивления, о чем свидетельствовали показатели IR и PI.

В результате проведенных исследований нами было отмечено, что ни один из доплерометрических показателей при использовании в качестве самостоятельного критерия не обеспечивает достаточно высокой диагностической информативности при определении глубины инвазии. В связи с этим мы пришли к выводу о целесообразности использования сочетания данных цветового или энергетического картирования и доплерометрии для повышения диагностической ценности этих методик.

Нами получены достоверные данные ($p < 0,05$) об увеличении количества цветных локусов неоваскуляризации в зависимости от увеличения глубины инвазии опухоли в миометрий (рис. 9).

При этом показатели IR и PI составили 0,41 и 0,52 при инвазии в миометрий до $\frac{1}{2}$ толщины, и 0,34 и 0,47 при инвазии опухоли $> \frac{1}{2}$ толщины миометрия. Снижение данных показателей ниже 0,4 для IR и 0,52 для PI мы расценили как косвенный признак инвазии опухоли (табл. 2).

При трехмерной реконструкции более четко визуализировали локализацию неоваскуляризации как внутри опухоли, так и на границе опухолевой ткани и миометрия, однако эти данные не имели достоверных отличий от стандартного исследования.

Обсуждение

Использование трехмерной эхографии в определенной мере расширяет диагностические возможности при раке эндометрия. Очевидно, что трехмерная эхография – современная диагностическая методика, значение которой в диагностике РТМ продолжают изучать.

Возможность одновременного исследования миометрия и эндометрия повышает диагностическую точность и по мнению D. Gruboesck, K. Jurkovic [10]. Вместе с тем, значение трехмерного сканирования в уточняющей диагностике рака эндометрия не столь бесспорно и его достаточно сложно оценить.

Будущие исследования покажут, сможет ли объемное исследование быть полезным для неинвазивной диагностики и предварительного отбора пациенток с диагнозом рак тела матки.

Таблица 1

Распределение больных РТМ в зависимости от локализации опухоли

Локализация опухоли:	Количество наблюдений (90)		Р	
	УЗИ			Морфологическое исследование
	2D	3D		
Дно	12 (13,3±1,9%)	28 (31,1±1,4%)	30 (33,3±1,4%)	P>0,05
Стенка	6 (6,7±2,0%)	6 (6,7±2,0%)	7 (7,8±2,0%)	
Дно+стенка	9 (10,0±1,6%)	10 (11,1±1,7%)	13 (14,4±2,0%)	
Трубные углы	4 (4,4±1,3%)	5 (5,6±1,3%)	6 (6,7±1,6%)	
По всей полости	59 (65,5±3,2%)	41 (45,6+/-2,8%)	34 (37,8±3,1%)	
Всего:	90 (100%)			

Таблица 2

Допплерометрические показатели кровотока на границе опухоли и миометрия при РТМ

Глубина инвазии опухоли	Сосуды на границе опухоль/миометрий				
	Vmax (м/с)	Vmin (м/с)	IR	PI	СДО
Нет (1)	0,61 ± 0,35	0,31 ± 0,12	0,55 ± 0,07	0,81 ± 0,25	2,0 ± 0,08
Поверхностная (2)	0,57 ± 0,14	0,25 ± 0,14	0,49 ± 0,08	0,77 ± 0,24	1,9 ± 0,1
До ½ (3)	0,45 ± 0,11	0,20 ± 0,12	0,41 ± 0,11	0,52 ± 0,45	1,7 ± 0,14
Более ½ (4)	0,38 ± 0,17	0,17 ± 0,11	0,34 ± 0,1	0,47 ± 0,35	1,5 ± 0,11
Достоверность	P>0,05	P>0,05	P<0,05 (1) и (3), (1) и (4)	P<0,05 (1) и (3), (1) и (4)	P>0,05

В.Е. Гаждонова и др. (2002), В.Н. Демидов и др. (1997), Сидорова И.С. и др. (2001), D. Jurcovic et al. (1995), A. Kyei-Mensah et al. (1996), L.T. Merce et al. (2006) [2; 3; 6; 11; 13; 15] выделяют следующие преимущества 3D эхографии в сравнении с 2D: возможность в цифровой форме хранить объемные эхографические данные, которые в любое время могут быть восстановлены и изучены; возможность работать с объемными данными и получать любые срезы через матку, ее придатки и тазовое дно (в том числе недоступные для двухмерной эхографии) даже в отсутствии пациента; одновременная корреляция трех ортогональных срезов в мультиплоскостной картинке; точные вычисления объема объекта (включая нерегулярные структуры, такие как эндометрий).

Очевидно, что трехмерная ультразвуковая томография позволяет получать объемные реконструкции матки, при этом достаточно точно определять размер первичной опухоли и ее локализацию. А эти факторы, как известно, имеют важное прогностическое значение.

В нашем исследовании отмечены определенные преимущества трехмерной эхографии, которые состоят в том, что в 53,0 % наблюдений стало возможным уточнить локализацию новообразования в области дна матки. При исследовании сосудистой сети новообразований 3D-эхография позволила несложно визуализировать многочисленные сосуды, проекционно накладывающиеся друг на друга, а также проследить их взаимоотношения с

другими сосудами и опухолями или окружающими тканями. Эта методика дает специалисту возможность интерактивно рассматривать трехмерное изображение на экране со всех сторон как единое целое, а не суммировать двухмерные эхограммы [12].

Хотя получение фронтальных срезов более наглядно демонстрирует характер распространения, локализацию и васкуляризацию опухоли тела матки, нами не получено достоверных данных при сравнении возможностей 3D и стандартной 2D эхографии при диагностике РТМ.

Выводы

Сравнительный анализ результатов комплексного ультразвукового обследования не выявил преимуществ трехмерной эхографии в уточняющей диагностике местнораспространенного рака тела матки. Вместе с тем, эта методика позволяет более точно установить локализацию опухоли эндометрия, что имеет немаловажное значение для адекватного планирования объема оперативного вмешательства у этого контингента больных.

Таким образом, трехмерное УЗИ – современный метод диагностики, значение которого для онкогинекологии в полном объеме еще предстоит оценить. Уже сейчас очевидно, что данная методика повышает точность ультразвукового исследования при определении местного распространения рака тела матки.

Литература

1. Белоусов М.А., Озерская И.А. Трехмерная эхография полости матки // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2003. – № 1. – С. 36–40.
2. Гажонова В.Е., Курганская Т.С., Зубарев А.В. и др. Трехмерная эхография в диагностике внутриматочной патологии у женщин с маточным кровотечением // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2002. – № 4. – С. 40–7.
3. Демидов В.Н., Гус А.И. Ультразвуковая диагностика гиперпластических и опухолевых процессов эндометрия / Под ред. В.В. Митькова, М.В. Медведева. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике, 3 т. – М.: Видар, 1997. – С. 120–31.
4. Зыкин Б.И., Медведев М.В. Эхографическая классификация опухолей и опухолевидных образований малого таза Российской ассоциации врачей ультразвуковой диагностики в перинатологии и гинекологии // Ультразвуковая диагностика. – 1998. – № 1. – С. 8–15.
5. Опухоли женской репродуктивной системы / Под редакцией академика РАН, академика РАМН, профессора М.И. Давыдова, профессора В.П. Летягина и профессора В.В. Кузнецова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2007. – С. 228–54.
6. Сидорова И.С., Гурьев Т.Д., Капустина И.Н. и др. Цветовая доплерометрия в диагностике гиперпластических процессов и рака эндометрия // Мед. виз. – 2001. – № 2. – С. 88–93.
7. Терезулова Л.Е. Трансвагинальная эхография с использованием цветового доплеровского картирования у больных раком эндометрия // Ультразвук. диагн. – 1996. – № 4. – С. 21–3.
8. Харченко Н.В. Возможности эхографии в первичной и уточняющих диагностиках рака эндометрия. – Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1996. – 22 с.
9. Ayida G., Kennedy S., Barlow D., Chamgerlaine P. Contrast sonography for uterine cavity assessment: A comparison of conventional two-dimensional with three-dimensional transvaginal ultrasound; a pilot study // Fertility and Sterility. – 1996. – 66(5). – P. 848–50.
10. Gruboeck K., Jurkovic D., Lawton F. et al. The diagnostic value of endometrial thickness and volume measurements by three-dimensional ultrasound in patients with postmenopausal bleeding // Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 1996. – 8. – P. 272–6.
11. Jurkovic D., Geipel A., Gruboeck K. et al. Three-dimensional ultrasound for the assessment of uterine anatomy and detection of congenital anomalies: a comparison with hysterosalpingography and two-dimensional sonography // Ultrasound Obstet. Gynecol. – 1995. – 5. – P. 238–40.
12. Kurjak A., Kupesic S. (Ed.) An atlas of transvaginal color Doppler. Second edition. – London: The Parthenon publishing group. New York, 2000. – P. 110–11.
13. Kyei-Mensah A., Maconochie N., Pittrof R. et al. Transvaginal three-dimensional ultrasound: Reproducibility of ovarian and endometrial volume measurements // Fertility and Sterility. – 1996. – 66(5). – P. 718–22.
14. Martins W.P. Reliability and validity of tissue volume measurement by three-dimensional ultrasound: an experimental model // Ultrasound Obstet Gynecol. – 2007. – 29. – P. 210–4.
15. Merce L.T. Endometrial volume and vascularity measurements by transvaginal three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography in stimulated and tumoral endometria: intraobserver reproducibility // Gynec. Oncol. – 2006. – 100(3) – P. 544–50.
16. Olaya F.J., Dualde D., Garcia E. et al. Transvaginal sonography in endometrial carcinoma: preoperative assessment of the depth of myometrial invasion in 50 cases // Eur. J. Radiol. – 1998. – 26(3). – P. 274–9.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ
КЛИНИЧЕСКОЙ
ОНКОЛОГИИГотовится к печати
Издательская группа РОНЦ

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006.444-02

*Л.В. Плетнева, А.Ф. Лазарев***ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ***Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул**ГУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», Барнаул***Контактная информация:***Плетнева Лариса Витальевна, врач онколог-радиолог***адрес:** 656049 г. Барнаул, ул. Никитина, 77; **тел./факс:** +7(3852)632620**e-mail:** aoc@ctmed.ru

Статья поступила: 28.01.2010, принята к печати 17.06.2010.

Резюме

Вопрос об этиологических факторах возникновения заболеваний злокачественными новообразованиями стал одним из наиболее популярных в литературе. Этиология злокачественных лимфом окончательно неизвестна и связана с множеством факторов. Изучение этиологических факторов, влияющих на развитие злокачественных заболеваний лимфатической системы, является одним из направлений профилактической онкологии.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, неходжкинские лимфомы, этиология.*L.V. Pletneva, A.F. Lazarev***ETIOLOGICAL FACTORS OF OCCURRENCE OF MALIGNANT LYMPHOMA***Altay Affiliation of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS,**Altay Regional Oncology Dispensary, Barnaul***Abstract**

One of the most popular phenomenon in literature became the question of etiological factors development malignant tumors. The etiology of malignant lymphoma is still unknown and connects with the set of factors. One of the directions of preventive oncology is the studying of the risk factors influencing development of malignant diseases of lymphatic system.

Key words: Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, etiology.**Введение**

Злокачественные лимфомы – это внекостномозговые опухоли лимфатической системы. Заболевание возникает уницентрично и распространяется метастатически. По мере прогрессирования в патологический процесс может вовлекаться костный мозг, что обозначается как лейкокемия процесса. Среди остальных локализаций злокачественные лимфомы выделяются относительно молодым возрастом больных. Ими, в частности лимфомой Ходжкина, в большой степени болеют пациенты детского и юношеского возраста. В течение года после установления диагноза умирает более четверти больных. Все это делает проблему социально важной и весьма актуальной. Необходим системный подход к изучению этиологических факторов развития злокачественных лимфом, что позволит впоследствии воздействовать на канцерогенез у здорового человека и предупредить развитие злокачественных новообразований.

Демографический, социальный и национальный факторы

При лимфоме Ходжкина существует два пика частоты заболевания: первый приходится на возраст 20–30 лет, второй – на возраст старше 50 лет.

В Японии до 40 лет болезнь встречается крайне редко. У детей и подростков также наблюдается двугорбовая кривая заболеваемости лимфомой Ходжкина: первый пик в 4–6 лет, второй – в 12–14 лет. Среди педиатрического контингента чаще встречаются дети нежной, грациальной конституции, преимущественно блондины с голубыми глазами [3; 44]. Неходжкинские лимфомы встречаются в различных возрастных группах с преобладанием у лиц, старше 45 лет [12; 14; 43; 58].

Частота злокачественных лимфом зависит от пола. Лимфомой Ходжкина в детской и юношеской группе чаще заболевают мальчики. У взрослых заболеваемость преобладает у женщин [31]. Неходжкинские лимфомы чаще встречаются у мужчин, причем это различие резко выражено в пожилом и старческом возрасте [27; 62].

В заболеваемости злокачественными лимфомами имеют значение национально-этнические факторы. LX представители негроидной массы болеют реже, чем белые. В Японии отмечается меньшая заболеваемость лимфомой Ходжкина, чем в Европе [44]. Максимальный уровень заболеваемости LX зарегистрирован у литовцев, армян, минимальный – у молдован, узбеков, киргизов.

В России более высокие показатели заболеваемости злокачественными лимфомами характерны для городских жителей [42].

Социальный фактор имеет значение особенно в развитии лимфомы Ходжкина. В малоразвитых странах и малообеспеченных слоях населения характерна высокая частота возникновения заболевания у детей и несколько более низкая у молодых взрослых. Напротив, в экономически развитых странах с высоким уровнем жизни населения лимфома Ходжкина у детей обнаруживается редко, чаще встречается у молодых взрослых [44].

Генетический фактор и наследственность

Об определенном значении генетических факторов в развитии злокачественных лимфом косвенно свидетельствует увеличение заболеваемости при некоторых генетических нарушениях и аномалиях развития [93]. Часто наблюдается развитие неходжкинских лимфом при наследственных болезнях, которые связаны с дефектами иммунитета. К ним относятся: атаксия-телеангиэктазия (синдром Луи-Бар), синдром Вискота-Олдрича, болезнь Братона [81; 91]. Лимфомы также часто встречаются при синдроме Чедиака-Хигаси [10].

Ряд исследователей считают, что роль генетических факторов ограничивается формированием предрасположенности к развитию заболевания, которая затем реализуется при воздействии различных факторов: лучевых, химических, других экзо- и эндогенных воздействий [29].

Наследственная предрасположенность выявлена и у лимфомы Ходжкина. Так, при данном заболевании мужчины в семье вероятность заболевания у его брата увеличивается в 9 раз, а у сестры – в 5 раз. При заболевании женщины в семье отмечается обратная картина [44].

При изучении родословных выявилась более высокая частота злокачественных новообразований в семьях больных хроническим лимфолейкозом, эритромией и лимфомой Ходжкина [40; 89].

Повышенный риск заболевания лимфомой Ходжкина отмечен среди родственников I степени (родители – дети, дети – родители, дети одной семьи). При этом учитывались длительное совместное проживание и контакт друг с другом, что предполагает наличие наследственной аномалии иммунитета и (или) возможность горизонтальной передачи заболевания по типу инфекционного [28; 76].

Отмечено, что в семьях больных злокачественными лимфомами преобладали раковые заболевания желудочно-кишечного тракта, реже другой локализации [40].

Ионизирующая радиация

Исследования показали, что ионизирующая радиация вызывает практически все формы гемобластозов, кроме лимфомы Ходжкина. Соотношение больные лейкозами – больные лимфомами среди облученного контингента составило 3,85:1, в контроле 1,61:1. [32].

У детей, облученных в раннем детстве по поводу гиперплазии тимуса, развивались острый лимфобластный лейкоз и лимфома [18].

Инфекционный фактор

В настоящее время наиболее широко обсуждается вирусная теория происхождения гемобластозов. Наиболее изучены два вида вирусов: ВЭБ и Т-клеточного лейкоза человека и лимфомы (HTLV-1) [33; 37; 100; 102; 112; 115]. ВЭБ инфицировано

более 90 % всего взрослого населения. Поэтому обнаружение ВЭБ-антител в крови или ВЭБ в опухоли является недостаточным для доказательства роли этого вируса в этиологии опухоли. Доказана этиологическая роль ВЭБ в возникновении лимфомы Беркитта [5; 90]. С ВЭБ ассоциированы почти 100 % случаев этого заболевания в эндемичных районах Африки. В неэндемичных регионах частота ВЭБ-ассоциированных случаев намного ниже [10; 18; 62; 64]. ВЭБ этиологически связан с другими неходжкинскими лимфомами и лимфомой Ходжкина [59; 90]. Не установлено, играет ли ВЭБ непосредственную роль в этиологии лимфомы Ходжкина, вызывает ли развитие неспецифической иммуносупрессии или широко распространяется в организме больного лимфомой Ходжкина в связи с уже имеющимися для его распространения благоприятным общим фоном в виде иммуносупрессии [44]. При обследовании районов, расположенных вблизи от Семипалатинского полигона, у местного населения в крови наблюдается высокий титр антител к онкогенному ВЭБ и одновременно возрастает частота возникновения гемобластозов. Установлено, что ВЭБ способен вызывать «двухударные» хромосомные абберации в культурах Т-лимфоцитов, полученных от облученных в результате инкорпорации радионуклидами людей, а также лиц,отягощенных наследственным дефектом в системе ДНК- репарации [22; 61].

Распространенность HTLV-1 среди населения значительно ниже, чем других онкогенных вирусов, и варьирует от 0,2 до 2 % в регионах с низкой инфицированностью и до 3–15 % в регионах с высокой инфицированностью. Роль вируса в этиологии Т-клеточного лейкоза взрослых подтверждена в аналитических эпидемиологических исследованиях [86; 114]. HTLV-1 был выделен от больных с Т-клеточными лимфомами, Т-клеточными лимфолейкозами, Т-клеточными неходжкинскими лимфомами [26; 68; 79], эритромии [55], а также от медицинского персонала, иногда – от реципиентов крови [103], особенно при множественных трансфузиях (больные гемофилией), изредка – от здоровых интактных лиц [29].

HTLV-1, встречаясь в ДНК клетки хозяина, вызывает качественные и количественные аномалии хромосом [97; 114]. HTLV-1 является экзогенным и распространяется в популяции горизонтальным путем, в т.ч., от мужа жене [68; 82; 111] и вертикальным путем через кормление ребенка грудью сероположительных матерей [5].

Эндемичные зоны были обнаружены на территории Японии, Африки, районе Карибского бассейна. Среди неходжкинских лимфом Т-фенотипа в Японии 33–35 % ассоциированы с HTLV-1, в США – 51 %.

В СССР частота обнаружения антител к HTLV-1 среди больных различными формами гемобластозов варьировала от 0 до 12,5 % [55]. Больные с другими не Т-клеточными новообразованиями оставались серонегативными.

В эндемичных очагах 25–37 % практически здоровых людей, главным образом среди родственников заболевших, имеют антитела к HTLV-1, тогда как в других частях мира антитела к вирусу имеют 1% практически здоровых людей [68]. Широкая инфицированность HTLV-1 отмечена не у всех жителей эндемичных зон Японии, а избирательно среди определенных этнических групп [54].

Обнаруженное в клетках смешение ВЭБ и HTLV-1 способствует повышению частоты развития лимфомы Беркитта [38].

Соглашаясь с вирусной этиологией гемобластозов, нельзя автоматически переносить на них взгляд как на инфекционный процесс. Против инфекции говорит тот факт, что до настоящего времени нет данных, когда родственники или медицинские работники, имевшие тесный контакт с больными, заболели этой болезнью [62]. Заболевание развивается тогда, когда на фоне вирусоносительства человек подвергается другим иммуносупрессивным воздействиям [19; 74]. Этот факт рассматривает теория онкогенов [19; 38; 79], согласно которой в клетках содержатся онкогенные вирусы – онкорнавирусы, активность которых подавлена клеточными репрессорами. Под влиянием физических или химических канцерогенов, радиации, иммунной недостаточности деятельность клеточных супрессоров ослабевает, вирус активируется, клетка малигнизируется.

Ряд работ посвящен изучению соотношения лимфом человека и животных, в том числе крупного рогатого скота, в связи с циркуляцией в природе онкогенных вирусов и возможности преодоления ими межвидовых барьеров [110]. У 20 % людей, больных лимфомой Ходжкина, сыворотка крови содержит антитела к групповому специфическому антигену вирусов лейкозов и сарком птиц [30].

Определенное значение в этиологии злокачественных лимфом может иметь банальная инфекция [17]. У больных чаще встречались указания в анамнезе на острые респираторные заболевания, грипп, другие вирусные инфекции, ангины [104], хронический тонзиллит, инфекционный мононуклеоз, фурункулез, туберкулез легких, первично-хронический бруцеллез [32; 44]. У больных неходжкинскими лимфомами чаще в анамнезе встречается вирусный гепатит С [102; 112; 115], у больных лимфомами Ходжкина – болезни кожи и подкожной клетчатки [49]. *Helicobacter pylori* может приводить к развитию В-клеточной лимфомы [18; 112]. Установлено также повышение частоты лимфоаденопатий, особенно у детей – до 30 % [34; 37].

Иммунологический статус, стресс

Развитие злокачественных лимфом опосредуется через врожденную (генетическую) недостаточность или особенности иммунной системы [10; 81; 95; 99; 102].

Предположено, что лимфома Ходжкина – это аутоиммунный процесс, являющийся следствием хронического иммунного конфликта в организме между опухолевыми и нормальными лимфоидными клетками [31]. Было показано, что в периферической крови у больных лимфомой Ходжкина циркулируют Т-лимфоциты с аномалиями хромосомного набора. О снижении Т-клеточного иммунитета также свидетельствует тонзиллэктомия и аппендэктомия, часто предшествующие развитию лимфомы Ходжкина [44].

Особую роль в развитии иммунодефицитных состояний играют вирусы, которые помимо Т-лимфоцитов могут инфицировать В-лимфоциты, макрофаги, фибробласты и эндотелиальные клетки [101]. На фоне снижения иммунитета активируются онкогенные вирусы, часто персистирующие в организме и широко распространенные в природе. При персистировании вируса в организме иммунокомпетентного хозяина промежуток времени между инфицированием и развитием опухоли может достигать многих лет, однако при СПИДе и других иммунодефицитах отмечается значительное ускорение развития неопластического процесса [77; 114]. Так, если в

популяции иммунокомпетентных лиц ВЭБ вызывает мононуклеоз, то у больных с иммунодефицитом дает начало развитию злокачественной лимфомы [75; 99].

Лимфома Беркитта, которая распространена в Африке, также связана с ВЭБ и возникает на фоне иммуносупрессии, вызываемой хронической малярией. Иммунодефицит играет основную роль в патогенезе саркомы Капоши, так как она встречается у 30 % заболевших СПИДом [75] и пациентов, леченных иммуносупрессивными препаратами, а также развивающаяся при вторичных дефицитах иммунитета различного происхождения в пожилом возрасте, когда пусковым моментом является дефективность Т-лимфоцитов-хелперов при наличии инфицирования вирусами группы Herpes, и, прежде всего, ЦМВ [33; 72; 114]. Дефицит Т-лимфоцитов часто предшествует развитию злокачественных В-клеточных лимфом. По мере углубления Т-клеточного иммунитета развивается неходжкинская лимфома. У реципиентов после трансплантации частота развития опухолей в 35 раз выше, в основном за счет увеличения частоты появления сарком и лимфом. Лимфомы появлялись в первые пять лет после трансплантации. Отмечена большая частота лимфом у реципиентов с группой крови А [28]. Гемотрансфузии в анамнезе могут быть фактором риска в развитии неходжкинских лимфом [83; 84]. При этом иммуносупрессивное действие оказывает непосредственно сама реакция «трансплантат–против–хозяина», а также иммуносупрессивная терапия [10].

Способствует нарушению иммунного гомеостаза воздействие малых доз ионизирующего излучения [25; 35].

Доказательством нарушения функций иммунной системы служат измененные показатели крови. Было выявлено снижение относительного и абсолютного содержания нейтрофилов, особенно числа лимфоцитов, достоверное снижение зрелых Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов и натуральных киллеров [16; 69], при неэффективности В-лимфопоэза [35], повышение содержания эозинофилов [34].

Стресс, особенно тяжелый, длительный и часто повторяющийся, оказывает воздействие на функции иммунной системы, снижая резистентность к опухолям, в том числе злокачественным лимфомам. При этом нарушается фагоцитарная и бактерицидная активность гранулоцитов, макрофагов, нормальных киллеров, уменьшаются Т-клетки, В-клетки, снижается количество иммуноглобулинов в крови [8; 98; 107; 113].

Таким же действием обладают глюкокортикоиды, уровень которых повышается при стрессе.

Существенное влияние на параметры иммунитета, а именно снижение иммуноглобулинов и Т-киллеров, оказывает физическое перенапряжение и повышенная инсоляция [57].

Электромагнитные поля

Результаты эпидемиологических и экспериментальных исследований, посвященных влиянию электромагнитных полей сверхнизкой частоты (ЭМП СНЧ) на развитие злокачественных лимфом неоднозначны, а порою противоречивы [92]. Опасный для здоровья уровень экспозиции составляет 2–4 мГ и выше.

В исследовании «случай – контроль», проводившемся на территории Московской области, у мужчин, экспонированных к электромагнитным излучениям СВЧ-диапазона, выявлен статистически достоверный риск развития лейкозов (ОР-4,36; $p < 0,002$) и лимфом (ОР-3,04; $p < 0,05$).

Установлено статистически значимое увеличение риска развития злокачественных новообразований у женщин, связанных с воздействием ЭМП ВЧ и УВЧ–диапазона (ОР-3,78; $p < 0,05$) [88]. Достоверное повышение смертности от лимфом выявлено у женщин – студийных работников, экспонированных к низким уровням неионизирующей радиации, со стажем работы 10–19 лет [53; 70; 92].

Данных о влиянии персональных компьютеров на развитие гемобластозов в литературе нет, хотя известно, что в процессе функционирования ПК излучает электромагнитные волны широкого спектра частот: от промышленной частоты до рентгеновского и более жесткого излучения [39].

В связи с летальностью большого контингента среди служащих Motorola, было проведено исследование всех основных причин смерти, в т.ч. и злокачественных лимфом, за период 1976–1996 гг. Риск оказался ниже 1,0 для всех лимфом [96]. Другое исследование, проведенное в США и включавшее результаты обследования 195775 работников производств по выпуску мобильных телефонов, которые занимались сборкой и тестированием телефонных аппаратов, не обнаружило взаимосвязи между воздействием излучений и развитием опухоли системы крови [47]. Крупное эпидемиологическое исследование, проведенное в Дании (включены 420000 человек – пользователей сотовых телефонов в период 1982–1995 гг.), также не выявило статистически значимого повышения риска лимфом у пользователей сотовых телефонов [15].

Химический фактор

Человек в своей повседневной жизни и профессиональной деятельности может подвергаться действию различных химических веществ, оказывающих канцерогенный эффект на кроветворную и лимфатическую ткани [73; 95; 109]. Как и при действии ионизирующего излучения, латентный период может составлять несколько лет [29; 62].

К таким веществам относят ПАУ, включающие бенз(а)пирен [9; 13; 18; 23; 27; 29; 49; 51; 52; 59; 66; 67; 78]. ПАУ находят в состав моторного топлива, сажи, смол, растворителей, минеральных масел, дегтя, асфальта, гудрона; используется для получения синтетического каучука, резины, стирола, полистирола, полиэфирных и насыщенных волокон, моющих средств, пленок, пластмасс, лакокрасочных материалов, лекарств. ПАУ обнаружен в табачном дыме, а также в копченой пище [59]. Основными источниками загрязнения атмосферного воздуха ПАУ являются предприятия металлургической, коксохимической, нефтеперерабатывающей, алюминиевой промышленности, ТЭЦ и автотранспорт [51].

Нитрозамины, индуцирующие развитие злокачественных лимфом, широко используются в промышленности (красители, смазочные масла, бензин, противокоррозионные материалы, производство резины и др.); их обнаруживают в лекарствах, табачном дыме, пище, богатой нитратами, в копченостях, пиве [9; 13; 17; 24; 52]. Четыреххлористый углерод, дисульфид углерод, пыль руды с содержанием никеля и меди способствуют развитию лимфом [48; 52].

Технический углерод, оксиды и соли тяжелых металлов, в т.ч. титана и свинца, хризондин [41], фталонитрил, используемых в полиграфическом производстве, повышают риск развития ретикуло-саркомы. Краситель основной синий К, используемый для печатания, оберток для кондитерских и молочных продуктов, вызывает лимфомы [23].

Пыль сульфидных медно-никелевых руд индуцирует лимфомы [7].

К другим опасным веществам, вызывающим злокачественные лимфомы, относят винилхлорид и поливинилхлорид [9; 23; 59], акриловые и метакриловые соединения в индустрии полимеров [11], хлоропрен, широко используемый при производстве синтетических каучуков, резино-технических изделий, латексов, клея [4; 67].

Гемотоксичным действием обладают пестициды (инсектициды, гербициды, фунгициды и др.) [17; 20; 21; 29; 45; 60; 63; 73; 87; 88; 109]. При этом учитывается необходимость высоких доз и постоянного воздействия.

Было выявлено статистически значимое повышение частоты неходжкинских лимфом среди сельского населения хлопкосеющих районов с повышенной химизацией, когда идет накопление потенциально токсичных для кроветворения химических соединений в почве, питьевой воде, пищевых продуктах [36].

Пестициды могут вызывать генетические изменения, причем этот эффект может проявляться во втором и третьем поколениях [2; 65; 94]. Выявлено супрессивное действие пестицидов [72; 78]. При совместном действии радиации и пестицидов наблюдается суммация их эффектов [21].

Повышенный риск возникновения лимфом отмечен для ДДТ и дихлофоса [46; 60; 65].

ОР при употреблении хлорированной питьевой воды составляет для лимфом 1,1–1,3.

Поражение клеточного и гуморального иммунитета, продолжительные расстройства деятельности желез внутренней секреции и вегетативной нервной системы, усугубляемые психическим стрессом, являются дополнительными факторами риска развития опухолей, особенно у лиц, подверженных действию ионизирующих излучений, токсичных химических веществ и других факторов [1; 69].

Факторы, связанные с родителями

Несмотря на наличие противоречивых данных, во многих исследованиях выявлена связь между экспозицией родителей к вредным профессиональным и бытовым факторам и развитием лимфом у детей [17; 85].

В исследовании, проведенном в ЦНИРРИ (Санкт-Петербург), в случае лимфомы Ходжкина практически для всех месяцев беременности и первых 6 мес. жизни ребенка была выявлена положительная корреляция между величинами геомагнитного индекса и временем появления опухолей у больных [70].

Так, среди отцов детей с лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами значимо больше, чем в контроле, была доля мужчин с экспозицией к ионизирующей радиации (ОР-10,6 и 13,9 соответственно). Работа отцов с радарными установками значимо повышала риск заболевания неходжкинскими лимфомами (ОР-12,0).

Матери детей с НХЛ чаще подвергались воздействию нефтепродуктов (3,3), химических веществ (3,3), в т.ч. пестицидов [49; 87]. В других наблюдениях зависимости между частотой злокачественных лимфом у потомства и радиоактивной дозой, поглощенной в гонадах родителей, не установлено [56]. При исследовании влияния курения родителей на здоровье потомства получены противоречивые данные. Так, выкуривание матерью 10 сигарет и более в день повышает риск развития лимфом вдвое.

Описано повышение риска развития неходжкинских лимфом при курении отца еще до зачатия [5; 80; 106]. В других работах такой связи обнаружено не было [50; 105; 106].

Курение не является фактором риска для возникновения неходжкинских лимфом, риск возникновения лимфомы Ходжкина, особенно у молодых, незначительны [71]. Курение повышает риск лимфоидных форм гемобластозов [66; 108].

Другие факторы

Масса ребенка при рождении может влиять на развитие в дальнейшем лимфом. Риск повышен у детей с низкой массой (менее 2500 г) для лейкозов – в 4,7 раза, для лимфом – в 4 раза и у детей, масса которых при рождении превышает 4 кг – в 1,5 раза [6; 17; 104].

Литература

1. *Абрамов В.В., Егоров Д.Н.* Нервная и иммунная системы в канцерогенезе. – Новосибирск, 1998, 102 с.
2. *Айриян А.П., Смбалян К.А.* Изучение репродуктивной функции, проживающих в зонах интенсивного применения пестицидов // Гигиена труда и проф. заболевания. – 1991. – № 3. – С. 14–6.
3. *Антонов А.М., Изопесков Е.Е.* Конституциональные, социальные, этнические и средовые аспекты формирования острого лейкоза детской популяции в Дагестане. – М., 1997. – С. 111–3.
4. *Бульбулян М.А., Маргарян А.Г.* К вопросу о канцерогенной опасности хлоропрена в условиях производства // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46, № 1. – С. 64–6.
5. *Белякова С.В., Смулевич В.Б.* Профессия родителей и другие факторы риска возникновения злокачественных новообразований у детей // Вопросы охраны материнства и детства. – 1990. – № 10. – С. 56–9.
6. *Берштейн Л.М.* Возраст, факторы внешней среды и гормональный канцерогенез // Вопросы онкологии. 2001. – Т. 47, № 2. – С. 148–54.
7. *Борисенкова Р.В., Павлов Л.Н., Луценко Л.А.* Об онкогенном действии пыли сульфидных медно-никелевых руд // Медицина труда и промышленная экология. – 2002. – № 1. – С. 7–11.
8. *Бухтояров О.В., Архангельский А.Е.* Доминантный подход к патогенезу, профилактике и терапии рака // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, № 3. – С. 253–61.
9. *Василенко И.Я., Москалев Ю.Н., Стрельцова В.Н.* Канцерогенный эффект ионизирующего излучения в комбинации с химическими и другими физическими агентами // Вопросы онкологии. – 1986. – Т. 32, № 2. – С. 3–14.
10. *Воробьев А.И., Бриллиант М.Д.* Об этиологии лейкозов человека // Терапевтический архив. – 1978. – Т. 50, № 7. – С. 3–10.
11. *Гейко О.И., Федотова И.В., Благодатин В.М.* Эпидемиолого-гигиенические аспекты оценки канцерогенного риска при производстве метакрилатов // Медицина труда и промышленная экология. – 1996. – № 2. – С. 4–7.
12. *Генкин А.А.* Опухолевые заболевания системы крови: возраст, уровень холестерина и количество эритроцитов // Терапевтический архив. – 1998. – № 3. – С. 61–8.
13. *Гимадеев М.М.* О профессиональном раке, обусловленном действием химических канцерогенных веществ // Казанский медицинский журнал. – 1974. – № 1. – С. 62–8.
14. *Давыдов М.И., Аксель Е.М.* Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004г // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2006. – Т. 17, № 3 (прил.1). – С. 30–127.
15. *Додина Л.Г., Поддубный Д.А., Сомов А.Ю.* Влияние электромагнитного излучения устройств сотовой связи на здоровье человека // Медицина труда и промышленная экология. – № 5. – С. 35–9
16. *Западинская Е.Э., Гастаева Г.Н.* Результаты исследований показателей периферической крови у работников торнового производства // Медицина труда и промышленная экология. – 2005. – № 3. – С. 13–21.
17. *Заридзе Д.Г.* Эпидемиология детских лейкозов // Архив патологии. – 1997. – Т. 59, № 5. – С. 65–70.
18. *Заридзе Д.Г.* Эпидемиология, механизмы канцерогенеза и профилактика рака // Архив патологии. – 2002. – Т. 64, № 2. – С. 53–61.
19. *Зильбер Л.А.* Об изучении этиологии и иммунологии опухолей // Вопросы онкологии. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 148–58.
20. *Иванов А.И., Васильев В.В.* Состояние здоровья населения на территориях интенсивного применения пестицидов // Гигиена и санитария. – 2005. – № 2. – С. 24–7.
21. *Иванов В.В.* Влияние острого сочетанного действия радиации и некоторых пестицидов на периферическую кровь крыс // Гигиена и санитария. – 1984. – № 9. – С. 40–3.
22. *Ильинских Н.Н., Ильин С.Ю., Ильинских И.Н. и др.* Факторы и механизмы, способствующие развитию состояния генетического неблагополучия у жителей Алтайского края // Вест. науч. программы «Семи-палатинский полигон». – 1994. – № 3. – С. 34–47.

Достоверно повышенный риск неходжкинских лимфом наблюдался в группе детей, у которых длительность грудного вскармливания не превышала 1 мес., в сравнении с детьми, находившимися на грудном вскармливании более 6 мес. [50].

Выводы

Учитывая, что известно большинство этиологических факторов возникновения злокачественных лимфом, необходимо определение степени влияния на риск развития данной онкопатологии как каждого отдельно взятого фактора, так и их комплекса.

Формирование групп риска с учетом действия максимального количества известных факторов риска позволит существенно повысить эффективность прицельной профилактики и, в конечном итоге, снизить смертность.

23. *Ильичева С.А.* Полиграфическое производство как источник канцерогенной опасности для работающих // Медицина труда и промышленная экология. – 1994. – № 7. – С. 21–4.
24. *Ильичева С.А., Заридзе Д.Г.* Увеличение множественной миеломы и неходжкинских злокачественных лимфом у женщин, работающих с органическими растворителями // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50, № 2. – С. 145–8.
25. *Ильичева С.А., Заридзе Д.Г.* Этиологические аспекты профессионального рака в полиграфической промышленности // Вестник Российской АМН. – 2004. – № 2. – С. 25–9.
26. *Калиберза И.В.* Ассоциация НТЛ V-I с различными формами гемобластозов. – Рига: Автореферат дисс. канд. мед. наук, 1988. – 20 с.
27. *Капран Р.Г.* Значение бария в развитии лейкозов. – Киев: Медгиз, 180 с.
28. *Киндзельский Л.П., Усатенко В.Д., Губарева А.А.* Семейные случаи ЛГМ // Экспериментальная онкология. – 1990. – Т. 12, № 1. – С. 61–3.
29. *Ковалева Л.Г.* Острые лейкозы. – М.: Медицина, 1990. – 271 с.
30. *Коломиец А.Г., Хлюстов С.В.* Пораженность ретровирусом лейкоза крупного рогатого скота и людей, контактирующих с больными животными // Здоровоохранение Белоруссии. – 1980. – № 11. – С. 45–7.
31. *Колыгин Б.А.* ЛГМ у детей. – Л.: Мед. наука, 1990. – 280 с.
32. *Косенко М.М., Дегтярева Р.Г., Петрушова Н.А.* Клинические и эпидемиологические характеристики случаев среди населения, подвергшихся хроническому радиоактивному облучению // Гематология и трансфузиология. – 1997. – Т. 42, № 2. – С. 27–31.
33. *Латин Б.А.* Роль вирусов в новообразованиях кроветворной системы // Вестник Рос. АМН. – 1995. – № 8. – С. 59–63.
34. *Лебедькова С.Е., Кацова Г.Б., Афанасьева Е.И.* Мониторинг клинико-гематологических и иммунологических показателей детей, проживающих в зоне высокой антропогенной нагрузки и следа ядерного взрыва // Гематология и трансфузиология. – 1997. – Т. 42, № 2. – С. 31–5.
35. *Ленская Р.В., Пивоварова А.И.* Результаты скрининговых гематологических и цитохимических исследований крови 906 детей, проживающих в Брянской области с разной плотностью загрязнения почвы цезием-137 и стронцием-90 // Гематология и трансфузиология. – 1995. – Т. 40, № 6. – С. 30–4.
36. *Маджедова М.С., Алиева Т.М.* Распространение лейкозов, лимфом, гипо- и апластических анемий среди жителей Ташкентской области // Медицинский журнал Узбекистана. – 1987. – № 11. – С. 24–7.
37. *Меликян А.П.* Вирус Эпштейна-Барр у больных затяжной лимфаденопатией // Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 52, № 4. – С. 21–7.
38. *Мерекалова З.И., Яковлева Л.С., Мазуренко Н.П., Орехова Н.М.* Влияние смешанной вирусной инфекции на развитие неоплазий, индуцированных онкогенными вирусами // Вопросы вирусологии. – 1988. – № 4. – С. 424–8.
39. *Пальцев Ю.П., Бузов А.Л., Кольчугин Ю.И.* Особенности контроля электромагнитного излучения персональных компьютеров // Мед. труда и пром. Экология. – 1996. – № 9. – С. 23–7.
40. *Патокова О.С., Нечаева О.Б.* Наследственное предрасположение к онкологическим заболеваниям у больных лейкозом // Вопросы онкологии. – 1976. – Т. 22, № 8. – С. 22–5.
41. *Петров Н.Н.* Основные вопросы возникновения и роста истинных опухолей // Вопросы онкологии. – 2005. – Т. 51, № 1. – С. 24–32.
42. *Писарева Л.Ф., Бояркина А.П., Недавняя О.И.* Злокачественные новообразования лимфатической и кроветворной ткани в регионе Сибири и Дальнего Востока (1976-1990гг.) // Российский онкологический журнал. – 2001. – № 6. – С. 32–6.
43. *Писарева Л.Ф., Бояркина А.П., Одинцова И.Н.* Заболеваемость гемобластомами населения Томской области // Гематология и трансфузиология. – 2004. – Т. 49, № 5. – С. 21–6.
44. *Поляков В.Е., Алексеевских Ю.Г., Даабуль С.А.* Болезнь Ходжкина (Лимфогранулематоз) у детей. – М.: МИРТ, 1993, 356 с.
45. *Поталов А.И.* Оценка риска при воздействии пестицидов на работающих // Вестник Российской АМН. – 2005. – № 3. – С. 4–7.
46. *Ракитский В.Н., Турусов В.С.* Мутагенная и канцерогенная активность химических соединений // Вестник Российской АМН. – 2005. – № 3. – С. 7–9.
47. *Румянцев Г.И., Прохоров Н.И., Несвижский Ю.В.* Анализ патогенетической значимости излучений мобильных телефонов // Вестник Российской АМН. – 2004. – № 6. – С. 31–5.
48. *Рушкевич О.П., Серебряков П.В., Луценко Л.А.* Промышленные аэрозоли – фактор риска развития онкологической патологии у подземных горнорабочих // Вестник Российской АМН. – 2005. – № 3. – С. 30–2.
49. *Смулевич В.Б., Соленова Л.Г., Белякова С.В.* Профессия родителей как фактор онкологического риска у детей // Российский онкологический журнал. – 2001. – № 4. – С. 45–47.
50. *Смулевич В.Б., Соленова Л.Г., Белякова С.В.* Факторы онкологического риска у детей // Российский онкологический журнал. – 2001. – № 3. – С. 43–5.
51. *Соколов В.В., Фраш В.Н.* Дискуссионные вопросы лейкозогенного действия бензола // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1985. – № 4. – С. 21–6.
52. *Соленова Л.Г.* Онкологическая заболеваемость работников производства резины // Вопросы онкологии. – 1992. – № 10. – С. 1174–82.
53. *Соленова Л.Г., Дымова Е.Г., Фир Н.* Общая и онкологическая смертность в когорте работников телевидения // Медицина труда и промышленная экология. – 2004. – № 5. – С. 21–4.

54. Степина В.Н. Серологическое обследование жителей Д.Востока на наличие антител к вирусу Т-клеточного лейкоза человека HTLV-1 // Экспериментальная онкология. – 1988. – Т. 10, № 1. – С. 37–9.
55. Степина В.Н., Сенюта Н.Б., Павлиш О.А. Гемобластозы, ассоциированные с HTLV-1, в различных регионах СССР // Вопросы вирусологии. – 1991. – Т. 36, № 2. – С. 159–62.
56. Сумина М.В. Медико-социальный статус больных, перенесших хроническую лучевую болезнь в отделенном периоде наблюдения // Медицина труда и промышленная экология. – 2005. – № 3. – С. 32–4.
57. Темурьянц Н.А., Тишкин О.Г. Влияние изменений солнечной активности на динамику заболеваемости и смертности населения // Терапевтический архив. – 1985. – № 5. – С. 150–2.
58. Толкушин А.Г., Огрызко Е.В., Ягудина Р.И. Анализ заболеваемости и контингентов больных злокачественными лимфомами в Российской Федерации // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52, № 4. – С. 392–7.
59. Турусов В.С. Роль экзогенных и эндогенных факторов в возникновении опухолей человека // Архив патологии. – 1983. – № 2. – С. 3–13.
60. Турусов В.С., Ракитский В.Н. Пестициды как негенотоксические канцерогены // Вопросы онкологии. – 1999. – Т. 45, № 2. – С. 118–23.
61. Хлопин Н.Г. Изучение влияния сыворотки крови и экстракта из лейкоцитов людей, больных лейкозами, на тканевые культуры // Вопросы онкологии. – 2005. – Т. 51, № 5. – С. 520–3.
62. Хохлова М.П. Вопросы этиологии, эпидемиологии и патологии лейкозов // Архив патологии. – 1972. – Т. 34, № 3. – С. 3–14.
63. Хрипач Л.В., Жуков В.С. Проблема оценки канцерогенной опасности диоксинов // Гигиена и санитария. – 2005. – № 6. – С. 24–7.
64. Чакобаева М.Г., Алкина Н.В., Косухина Н.В. Определение генотипа вируса Эпштейна-Барр у больных гемобластозами людей на юге России // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т. 45, № 3. – С. 19–21.
65. Шабад Л.М., Колесниченко Т.С., Никонова Т.В. О возможности бластомогенности ДДТ // Вопросы питания. – 1972. – № 1. – С. 63–6.
66. Шабад Л.М., Пылев Л.Н., Насыров Р.И. Роль некоторых физических свойств различных промышленных видов сажи при выделении из них бенз(а)пирена // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1972. – № 1. – С. 9–12.
67. Шаньгина О.В., Бульбулян М.А. Новые аспекты канцерогенной опасности в обувных производствах // Медицина труда и промышленная экология. – 1998. – № 1. – С. 8–12.
68. Шевлягин В.Я. Вирус, вызывающий Т-клеточные лимфомы-лейкозы человека // Вопросы вирусологии. – 1985. – Т. 30, № 3. – С. 260–5.
69. Шубик В.М. Иммуитет и неспецифическая защита у людей, работающих в условиях хронического воздействия малых доз ионизирующих излучений // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1991. – № 4. – С. 29–31.
70. Ямшианов В.А. Геомагнитные вариации в раннем онтогенезе как фактор риска онкопатологии // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49, № 5. – С. 608–11.
71. Adami J., Nyrin O., Bergström R. et al. Smoking and the risk of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma (Sweden) // Cancer Causes Control. – 1998. – 9(1). – P. 49–56.
72. Arndt V., Vine M.F., Weigle K. Environmental chemical exposures and risk of herpes zoster // Environ Health Perspect. – 1999. – 107(10). – P. 835–41.
73. Avnon L., Oryan I., Kordysh E. et al. Cancer incidence and risks in selected agricultural settlements in the Negev of Israel // Environ Health. – 1998. – 53(5). – P. 336–43.
74. Bangham C.R. HTLV-1 infections // Clin. Athol. – 2000. – 53(8). – P. 581–6.
75. Bazarbachi A., Canivet M., Perius J. Role of retroviruses in human cancerogenesis // Bull. Cancer. – 1995. – 82(Suppl.2). – P. 85–92.
76. Bener A., Denic S., Al-Mazrouei M. Consanguinity and family history of cancer in children with leukemia and lymphomas // Cancer. – 2001. – 92(1). – P. 1–6.
77. Biggar R.J., Engels E.A., Frisch M., Goedert J.J. Risk of T-cell lymphomas in persons with AIDS // J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. – 2001. – 26(4). – P. 371–6.
78. Blair A., Zahm S.H. Agricultural exposures and cancer // Environ Health Perspect. – 1995. – 103(Suppl. 8). – P. 205–8.
79. Blattner W.A. Human retroviruses: their role in cancer // Proc. Assoc. Am. Physicians. – 1999. – 111(6). – P. 563–72.
80. Boffetta P., Trüdan J., Greco A. Risk of childhood cancer and adult lung cancer after childhood exposure to passive smoke: A meta-analysis // Environ Health Perspect. – 2000. – 108(1). – P. 73–82.
81. Canman C.E., Lim D.S. The role of ATM in DNA damage responses and cancer // Oncogene. – 1998. – 17(25). – P. 3301–8.
82. Cartwright R.A., Gurney K.A., Moorman A.V. Sex ratios and the risks of haematological malignancies // Br. J. Haematol. – 2002. – 118(4). – P. 1071–7.
83. Cerhan J.R., Janney C.A., Vachon C.M. et al. Anthropometric characteristics, physical activity, and risk of non-Hodgkin's lymphoma subtypes and B-cell chronic lymphocytic leukemia: a prospective study // Am. J. Epidemiol. – 2002. – 156(6). – P. 527–35.
84. Cerhan J.R., Wallace R.B., Dick F. et al. Blood transfusions and risk of non-hodgkin's lymphoma subtypes and chronic lymphocytic leukemia // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2001. – 10(4). – P. 361–8.

85. Draper G.J., Little M.P., Sorahan T. et al. Cancer in the offspring of radiation workers: a record linkage study // B.M.J. – 1997. – 315(7117). – P. 1181–8.
86. Edlich R.F., Arnette J.A., Williams F.M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I) // J. Emerg. Med. – 2000. – 18(1). – P. 109–19.
87. Fontana A., Picoco C., Masala G. et al. Incidence rates of lymphomas and environmental measurements of phenoxy herbicides: ecological analysis and case-control study // Arch. Environ Health. – 1998. – 53(6). – P. 384–7.
88. Gurvich E.B., Novokhatskaia E.A., Rubtsova N.B. Role of electromagnetic irradiation of various frequencies in the etiology of hemoblastoses // Med. Tr. Prom. Ekol. – 1995. – № 8. – P. 40–3.
89. Hemminki K., Mutanen P. Parental cancer as a risk factor for nine common childhood malignancies // Br. J. Cancer. – 2001. – 84(7). – P. 990–3.
90. Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans // Int. J. Hematol. – 2000. – 71, № 2. – P. 108–17.
91. Khanna K.K. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate // Natl. Cancer Inst. – 2000. – 92(10). – P. 795–802.
92. Kheifets L.I. Bioelectromagnetics, 2001. – Suppl. 5. – P. S120–S131.
93. Mann G., Trebo M.M., Haas O.A. et al. Philadelphia chromosome-positive mature B-cell (Burkitt cell) leukaemia // Br. J. Haematol. – 2002. – 118(2). – P. 559–62.
94. Zahm S.H., Ward M.H. Pesticides and childhood cancer // Environ Health Perspect. – 1998. – 106(Suppl.3). – P. 893–908.
95. Miligi L., Seniori Costantini A. et al. Occupational, environmental, and life-style factors associated with the risk of hematolymphopoietic malignancies in women // Am. J. Ind. Med. – 1999. – 36(1). – P. 60–9.
96. Morgan R.W., Kelsh M.A., Zhao K. et al. Radiofrequency exposure and mortality from cancer of the brain and lymphatic/hematopoietic systems // Epidemiology. – 2000. – 11(2). – P. 118–27.
97. Mortreux F., Gabet A.S., Wattel E. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo // Leukemia. – 2003. – 17(1). – P. 26–38.
98. Nielsen N.R., Zhang Z.F., Kristensen T.S. et al. Self reported stress and risk of breast cancer: prospective cohort study // Brit. Med. J. – 2005. – 331. – P. 548.
99. Nordström M., Hardell L., Linde A. et al. Elevated antibody levels to Epstein-Barr virus antigens in patients with hairy cell leukemia compared to controls in relation to exposure to pesticides, organic solvents, animals, and exhausts // Oncol. Res. – 1999. – 11(11–12). – P. 539–44.
100. Polesz B.J., Polesz M.J., Choi D. The human T-cell lymphoma/leukemia viruses // Cancer Invest. – 2003. – 21(2). – P. 253–77.
101. Pollock B.H., Jenson H.B., Leach C.T. et al. Risk factors for pediatric human immunodeficiency virus-related malignancy // J.A.M.A. – 2003. – 289(18). – P. 2393–9.
102. Pozzato G., Mazzaro C., Santini G. et al. Hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphomas // Leuk. Lymphoma. – 1996. – 22. – P. 53–60.
103. Price J., Cant B.A., Barbara J.A., Tedder R. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus risk may be enhanced in some selected donor populations // Vox. Sang. – 2001. – 80(3). – P. 148–50.
104. Ross J., Davies S.M., Potter J.D. et al. // Epidemiol. Rev. – 1994. – 16. – P. 243–72.
105. Sasco A.J., Vainio H. From in utero and childhood exposure to parental smoking to childhood cancer: a possible link and the need for action // Hum. Exp. Toxicol. – 1999. – 18(4). – P. 192–201.
106. Shu X.O., Ross J.A. Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a Childrens Cancer Group study // J. Natl. Cancer Inst. – 1996. – 88(1). – P. 24–31.
107. Sood A.K., Bhaty R., Kamat A.A. et al. Stress hormonemediated invasion of ovarian cancer cells // Clin. Cancer Res. – 2006. – 12. – P. 369–75.
108. Stagnaro E., Ramazzotti V., Crosignani P. et al. Smoking and hematolymphopoietic malignancies // Cancer Causes Control. – 2001. – 12(4). – P. 325–34.
109. Stagnaro E., Tiberti D., Panniza G., Vercelli M. Herbicides and neoplasms of the hemolymphopoietic system // G. Ital. Med. Lav., 1995, 17, № 1–6, P. 17–8.
110. Tajima S., Takahashi M. A mutant form of the tax protein of bovine leukemia virus (BLV), with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV in vitro but not in vivo // J. Virol. – 2003. – 77(3). – P. 1894–903.
111. Taylor G.P. The epidemiology of HTLV-I in Europe // J. Acquir Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. – 1996. – 13(Suppl.1). – P. 8–14.
112. Timuraglu A., Colak D., Oğuz D., Karadogan I. Hepatitis C virus association with non-Hodgkin's lymphoma // Haematologia (Budap). – 1999. – 29(4). – P. 301–4.
113. Vedhara K., Irwin M. Human psychoneuroimmunology. – New York: Oxford University Press, 2005.
114. Volkers N. Wheezing, sneezing, and cancer risk – still an open door // J. Natl. Cancer Inst. – 1999. – 91(22). – P. 1916–8.
115. Vuillemin E., Croquet V., Oberti F. et al. Survenue d'un lymphome non hodgkinien au cours d'une hépatite chronique virale C // Rev. Med. Interne. – 1998. – 19(5). – P. 341–3.

УДК 616-006.04+616.972].000.93

*В.А. Хайленко^{1,2}, В.А. Агафонов¹, Т.Х. Мень², Е.Ф. Ткачева¹, А.В. Дударев³,
А.М. Сдвижков⁴, П.Г. Богущ⁵, Э.И. Мордухович⁶*

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ И СИФИЛИС: ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И СОВРЕМЕННОСТЬ

¹Кафедра онкологии ФУВ ГОУ ВПО «РГМУ им. Н.И. Пирогова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

³Городская клиническая больница № 14 им. В.Г. Короленко Департамента здравоохранения города Москвы

⁴Онкологический клинический диспансер № 1 Департамента здравоохранения города Москвы

⁵Кожно-венерологический клинический диспансер № 1 Департамента здравоохранения города Москвы

⁶ООО «Инфотел», Москва

Контактная информация:

Хайленко Виктор Алексеевич, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой онкологии факультета усовершенствования врачей

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7 (495) 324-12-80

e-mail: v.khaylenko@mail.ru

Статья поступила: 22.03.2010, принята к печати 00.00.0000.

Резюме

В статье обсуждается влияние сифилиса на частоту развития злокачественных опухолей человека. Исследование проведено в группе 5791 больного, у которых в 1976–1986 гг. был установлен диагноз «сифилис». Все больные – жители г. Москвы. Они получали стандартное лечение по поводу сифилиса в специализированной городской клинической больнице № 14 им. В.Г. Короленко. В исследуемой когорте, прослеженной до 31. XII. 2007 г., зарегистрировано 194 случая ЗО. Показано, что общая заболеваемость ЗО, без учета локализаций, у больных сифилисом оказалась достоверно ниже, чем в общей популяции – как у мужчин (SIR=0,7; ДИ 0,6–0,8), так и у женщин (SIR=0,5; ДИ 0,4–0,6). При этом у мужчин достоверно более низкой оказалась заболеваемость раком желудка (SIR=0,4; ДИ 0,2–0,7) и раком легкого (SIR=0,5; ДИ 0,3–0,7), а у женщин ЗО молочной железы (SIR=0,6; ДИ 0,4–0,9), кожи (SIR=0,3; ДИ 0,1–0,8) и половых органов (SIR=0,4; ДИ 0,2–0,8). В то же время у мужчин, заболевших сифилисом, достоверно чаще выявлялись ЗО языка (SIR=2,9; ДИ 1,1–6,3). Достоверных различий для других локализаций по сравнению с общей популяцией не выявлено.

Ключевые слова: злокачественные опухоли, сифилис.

*V.A. Khaylenko^{1,2}, V.A. Agafonov¹, T.H. Men², E.F. Tkacheva¹, A.V. Dudarev³,
A.M. Sdvizhkov⁴, P.G. Bogush⁵, E.I. Mordukhovich⁶*

CANCER AND SYPHILIS:

HISTORICAL AND CONTEMPORARY CORRELATES

¹Chair of Oncology, Faculty of Advanced Medical Training N.I. Pirogov Russian State Medical University, Moscow

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

³V.G. Korolenko Municipal Clinical Hospital No. 14, Moscow

⁴Cancer Clinic No. 1, Moscow

⁵Dermatovenerologic Clinic No. 1, Moscow

⁶«Infotel», LTD, Moscow

Abstract

Here we discuss the influence of syphilis on occurrence of cancer in humans. In this study were enrolled 5791 patients with the diagnosis of syphilis estimated between 1976 and 1986. All the patients were Moscow citizens and received standard treatment for syphilis at a specialized V.G. Korolenko Municipal Clinical Hospital No. 14. During the follow-up till 31.12.2007, 194 patients developed cancer. Overall (all sites) cancer incidence was significantly lower (95%) in patients with syphilis than in general population both for men (SIR 0.7, CI 0.6–0.8) and women (SIR 0.5, CI 0.4–0.6). Incidence of cancer of the stomach (SIR 0.4, CI 0.2–0.7) and lung (SIR 0.5, CI 0.3–0.7) was significantly lower in males, while cancer of the breast (SIR 0.6, CI 0.4–0.9), skin (SIR 0.3, CI 0.1–0.8) and genitals (SIR 0.4, CI 0.2–0.8) occurred less frequently in females. In contrary, incidence of cancer of the tongue was significantly higher in male patients with syphilis (SIR 2.9, CI 1.1–6.3). There were no significant differences in incidence of cancer of other localization between syphilis cohort and general population.

Key words: cancer, syphilis.

Введение

В настоящее время доказано участие микроорганизмов в этиологии и патогенезе ряда онкологических заболеваний. В число возбудителей инфекционных заболеваний, напрямую связанных с риском развития ЗО, входят: ВПЧ – рак шейки матки, рак анального канала; вирус гепатита В – гепатоцеллюлярный

рак; *helicobacter pylori* – рак желудка, MALT-лимфома; герпесвирус человека 2 типа – рак шейки матки; герпесвирус человека 4 типа (ВЭБ) – рак носоглотки, лимфома Беркитта; герпесвирус человека 8 типа – саркома Капоши, лимфома серозных покровов; Т-лимфотропный вирус человека 1 типа (HTLV-I) – Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых; ВИЧ – саркома Капоши, лимфомы [3; 20; 50].

За открытие связи вируса папилломы человека и рака шейки матки научный директор немецкого Центра по изучению раковых заболеваний в Хайдельберге профессор Гаральд цур Хаузен (Harald zur Hausen) в 2008 г. удостоен звания Лауреата Нобелевской премии по медицине и физиологии. Этот феномен лег в основу создания первой в мире вакцины для профилактики папилломавирусной инфекции 16; 18 типов. Эти два типа вируса обуславливают возникновение почти 70 % рака шейки матки. Вакцина, получившая название «Гардасил» (Merck&Co Inc), одобрена Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) и разрешена к клиническому применению в России. Вакцинация женщин, ранее не контактирующих с вирусами папилломы человека 16 и 18 типов, предотвращает развитие у вакцинируемых предраковых заболеваний шейки матки. Кроме того, показано, что данная вакцина эффективна в профилактике предраковых заболеваний вульвы и влагалища, связанных с вирусом папилломы человека. В итоговом сообщении Американского общества клинической онкологии (ASCO) за 2007 г. отмечено, что создание и внедрение вакцины «Гардасил» – главное достижение в первичной профилактике онкологических заболеваний [47].

В современных списках микроорганизмов, играющих роль в онкогенезе, нет возбудителя сифилиса – бледной спирохеты. Однако исторически именно она была пионером среди «возмутителей спокойствия». Указания на связь сифилиса в развитии рака было высказано еще в XVI веке [15]. Эволюцию представлений о роли сифилиса в патогенезе злокачественных новообразований условно можно разделить на три периода:

1. Первый: с момента описания сифилиса как самостоятельного заболевания Д. Фракасторо в 1530 г. [26] до лечения препаратами мышьяка в 1909 г. [12].
2. Статистические исследования сочетания сифилиса и рака в период лечения препаратами мышьяка, являющегося, по мнению Н.Л. Brose (1935) и G.W. Harding II (1936), канцерогенным агентом – с 1909 г. до 1960-х гг.
3. Эра пенициллинотерапии сифилиса – с середины 1960-х гг. до настоящего времени – характеризуется практически полным отсутствием научных работ в отечественной и единичными работами в зарубежной литературе, посвященных влиянию сифилиса на возникновение и течение онкологических заболеваний.

До того времени, пока висцеральный сифилис не стал предметом обстоятельного изучения, поражения внутренних органов при сифилисе объяснялись перерождением сифилиса «во всевозможные хронические недуги: рак и т.п.» [22].

Со временем сифилис стали считать несомненным с «некоторыми худосочиями, например, раковым» [40]. При этом «некоторые авторы утверждали наличие иммунитета к раку у больных сифилисом» [49]. Столь категорические высказывания побудили многих исследователей заняться изучением вопроса, в результате чего, начиная с середины XIX века и до середины XX, было опубликовано большое количество работ, посвященных сочетанию сифилиса и рака.

Оказалось, что все не так просто и однозначно. По мнению Lerrey d'Etioles (1843) приблизительно в 20% случаев сифилис является фактором, способствующим развитию ЗО. Более осторожно высказывался в 1886 г. проф. E. Lang, который считал развитие рака на фоне сифилиса «простым осложнением» [41]. В 1872 г. Fr. Esmarch обнаружил более частое развитие у больных сифилисом соединительнотканых опухолей (сарком) по сравнению с карциномами [35].

Внедрение в 1906 г. в клиническую практику реакции Вассермана послужило новым толчком в изучении частоты сифилиса у больных раком различной локализации на большом клиническом материале: N.A. Cary (Johns Hopkins Hospital, США – 771 больных (1920 г.); H.J.B. Fry (Лондон) – 1000 больных (1929 г.); G.H. Belote (Ann Arbor, Michigan, США) – 1267 больных (1931 г.); C.C. Lund (США) – 1570 больных (1933 г.); Я. Е. Шапиро (Москва) – 1270 больных (1934 г.); M.L. Levin et al. (New-York State, США), – 7761 больной (1942 г.); G.W. Harding II (Австралия) – 277 больных (1942 г.); J. Rojel (Дания) – 1193 больных (1953 г) [32; 38; 30; 44; 28; 43; 39; 48]. Все авторы единодушны во мнении о провоцирующей роли сифилиса в процессе онкогенеза.

Лишь в исследовании Н.Л.В. Fry частота положительной реакции Вассермана в группе из 1000 больных раком и в контрольной группе из 868 неонкологических больных составила 9,7 и 13,2 % соответственно, что позволило автору сделать вывод: сифилис не является этиологическим фактором в развитии рака [38].

Суммарные результаты упомянутых выше исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1
Частота больных сифилисом (клинически ± РВ⁺) при различных локализациях злокачественных новообразований

Диагноз	п онкобольных	п больных сифилисом ± RW	Источники
Рак языка	842	14,4–35%	30; 32; 43; 44
Рак слизистой полости рта	1173	4,6–20%	32; 38; 44
Рак шейки матки	2582	3,9–15,8%	30; 39; 43; 48
Рак губы	558	3,6–8,8%	30; 32; 38
Рак вульвы	17	8%	30
Рак желудка	242	3,7%	30
Рак прямой кишки	85	3,5%	30
Рак молочной железы	215	3,2%	30
Рак тела матки	35	0%	30
Рак пениса	23	0%	30; 37

Как видно из табл. 1, среди различных локализаций рака у больных сифилисом на первом месте стоит рак языка, слизистой полости рта и рак шейки матки.

Большое значение в этиологии рака языка и слизистой ротовой полости многие авторы придают курению и плохим, раздражающим слизистую языка, зубам; причем промежуточной стадией между приобретенным или врожденным сифилисом и раком слизистой полости рта P. Sebileau (1932 г.) считал лейкоплакию: «нет рака языка без лейкоплакии, нет лейкоплакии без сифилиса». В исследовании M. Fournier (1906 г.) сифилитическая лейкоплакия при раке слизистой полости рта наблюдались у 155 больных из 184 (84 %) [36].

В исследовании N.A. Cary (1920 г.) при сифилисе рак языка наблюдался в 3 раза чаще, чем рак других частей слизистой ротовой полости [32]. Средний возраст у больных раком языка, развившимся после сифилиса, составлял 54 года, без сифилиса – 62 года [29], больные сифилисом, по данным G.W. Harding II (1936), заболевали раком шейки матки в среднем на 4 года раньше – в 47 и 51 год соответственно [39].

По мнению К. П. Худяковой (1935 г.), «процент сифилиса среди гинекологических раковых больных настолько высок, что исключает случайность сочетания этих болезней» (131 из 650 больных – 20 %). Это обстоятельство дало основание автору считать сифилис «одним из главных факторов в этиологии рака шейки матки» [27].

Примечательно преобладание более поздних стадий рака шейки матки у больных сифилисом по сравнению с пациентками без сифилиса [48] (табл. 2).

Приведенные данные литературы первых двух периодов истории взаимоотношений между сифилисом и раком в свое время образно охарактеризовал В.Р.Том: в XIX веке «маятник качнулся в противоположную сторону» и сифилис из антагониста злокачественных новообразований превратился, по выражению J. Cruveilhier, в «колыбель рака» («le lit du cancer») [49].

В третьем периоде, начиная с 1958 г. по настоящее время, в отечественной литературе описаны единичные случаи сочетания сифилиса и рака с акцентом на дифференциальную диагностику и лечение больных: Л.Д. Новинская (1958 г.); А.С. Рабен с соавт. (1970 г.); Ю.П. Федоров с соавт. (1985 г.); В.П. Быкова с соавт. (1991 г.); Е.С. Рысс (1994 г.); Н.В. Тихомирова (1997 г.); И.Л. Викторова (1998 г.); Т.П. Пискалова с соавт. (2000 г.); В.М. Легостаев (2004 г.); К.В. Растольцев (2005 г.) [13; 16; 24; 1; 19; 23; 2; 14; 9; 18].

Лишь в работе Г.Н. Мглоблишвили (1974 г.) на основании анализа результатов 19-летнего (1946–1965 г.г.) наблюдения сочетания сифилиса и рака гортани сделан вывод о наличии «антагонизма» между раком и сифилисом [11].

Данное клиническое исследование было проведено с целью изучения развития ЗО у больных сифилисом на этапе антибактериальной терапии.

Материалы и методы

Для ответа на поставленные вопросы из архива были взяты истории болезни 7165 москвичей в возрасте 15 лет и старше за период 1976–1986 гг., больных сифилисом, – всех, находившихся на лечении в ГКБ №14 им. В.Г. Короленко г. Москвы с 01.01.1976 г. по 31.12.1986 г., и прослежена их судьба до 31.12.2007г. по данным канцеррегистра г. Мо-

сквы, отдела адресно-справочной работы и информационных ресурсов УФМС России по г. Москве, центрального ЗАГСа г. Москвы, телефонных контактов с пациентами или членами их семей.

Из историй болезни на специально разработанные нами карты о каждом больном сифилисом заносилась следующая информация: год рождения, пол, дата установления диагноза «сифилис», результаты серологических реакций. В исследовании не учитывались факторы риска: табакокурение, профессиональные вредности и сопутствующие заболевания (гепатиты, ВИЧ-инфекция, папилломавирусносительство). Из данных канцеррегистра в карту заносили: диагноз онкологического заболевания, результаты гистологического исследования опухоли, дату установления злокачественной опухолевой патологии, дату смерти, если больной умер.

Из 7165 исходно взятых для ретроспективного анализа данных о пациентах, заболевших сифилисом, нами прослежено 5797. По разным причинам (смена фамилии, переезд в другой регион РФ, эмиграция из страны и др.) не удалось проследить судьбу 1368 больных, что послужило причиной исключения их из исследования. Также были исключены 6 пациентов, заболевшие раком раньше, чем сифилисом, и те, кто заболел ЗО в течение первого года после установления диагноза сифилиса. Таким образом, окончательно в исследование вошел 5791 пациент.

Для оценки онкологической заболеваемости и смертности среди них были рассчитаны: число случаев заболевания ЗО и смерти от них среди членов исследуемой когорты, зарегистрированные за период 1988–2007 гг., по полу, возрасту и календарному периоду; число человеко-лет наблюдения по полу, возрасту и соответствующие показатели заболеваемости и смертности. При расчете человеко-лет наблюдения использовался точный алгоритм [31].

Пациенты прослеживались от даты заболевания сифилисом до наименьшей из трех дат: даты установления онкологического заболевания, даты смерти или даты окончания исследования (31.12.2007). Общее количество человеко-лет наблюдения за период 1986–2007 гг. составило 113005.

Для сравнения онкологической заболеваемости и смертности среди пациентов исследуемой когорты с популяционными показателями для каждого пола и локализации вычислялись стандартизованные отношения заболеваемости SIR (Standardized Incidence Ratio) и смертности SMR (Standardized Mortality Ratio):

$$SIR (SMR) = \frac{\sum C_i}{\sum P_i \times R_i}, \text{ где}$$

$\sum C_i$ – наблюдаемая сумма случаев заболевания (смерти) ЗО по всем возрастным группам когорты за указанный период ($i = 1, 2, \dots$), $\sum P_i \times R_i$ – ожидаемая сумма случаев (сумма произведений числа человек-наблюдения в i -ой возрастной группе когорты – P_i и показателя заболеваемости смертности в i -ой возрастной группе стандартного населения – R_i) [31].

В качестве стандарта использовались показатели заболеваемости и смертности населения г. Москвы. Необходимые данные для расчета стандартов о числе впервые заболевших (умерших) ЗО по полу, возрасту, локализации и календарному году за 1988–2007 гг. получены в МЗ и СР России. Соответствующие данные о численности населения получены в Мосгорстате.

Таблица 2

Распределение больных раком шейки матки по стадиям (Jorgen Rojel, 1953)

Группа больных	Всего	I ст.	II ст.	III ст.	IV ст.	Стадия не установлена
Сифилис –	1026(100 %)	151(14,7 %)	435(42,4 %)	258(25,2 %)	92(8,9 %)	90(8,8 %)
Сифилис +	167(100 %)	28(16,7 %)	37(22,1 %)	51(30,5 %)	40(23,9 %)	11(6,8 %)
Итого	1193	179	472	309	132	101

Таблица 3

Средний возраст и число больных сифилисом по полу и возрасту анализируемой когорты

Возрастные группы	Оба пола	Мужчины	Женщины
Средний возраст (лет)	32,8	33,5	31,9
В т.ч. в возрасте:			
15–19	308	113	195
20–24	1218	644	574
25–29	1350	801	549
30–34	974	589	385
35–39	645	405	240
40–44	493	314	179
45–49	333	205	128
50–54	230	130	100
55–59	119	76	43
60–64	71	46	25
65–69	25	16	9
70–74	16	10	6
75–79	5	3	2
80 и старше	4	2	2
Общее количество	n=5791	n=3354	n=2437

Таблица 4

Средний возраст и распределение заболевших злокачественными опухолями членов когорты по полу и возрасту

Больные ЗНО	Оба пола	Мужчины	Женщины
Общее количество	194	127	67
Средний возраст (лет)	58,5	59,3	57,2
В т.ч. в возрасте			
30–34	2	0	2
35–39	4	2	2
40–44	16	7	9
45–49	28	21	7
50–54	27	14	13
55–59	35	24	11
60–64	25	21	4
65–69	23	18	5
70–74	21	13	8
75–79	7	3	4
80 и старше	6	4	2

Таблица 5

Распределение по локализациям случаев злокачественных опухолей, диагностированных у больных сифилисом в возрасте 15 лет и старше за период 1988–2007 гг.

МКБ-10	Локализация ЗНО, диагноз	Число случаев		
		Оба пола	Мужчины	Женщины
C1–2	Язык	6	6	0
C4	Дно полости рта	1	1	0
C10	Ротоглотка	3	3	0
C13	Нижняя часть глотки	2	2	0
C15	Пищевод	8	8	0
C16	Желудок	12	9	3
C18	Ободочная кишка	14	8	6
C19–21	Прямая кишка, ректосигмоидное соединение, анус	14	13	1
C22	Печень и внутрипеченочные желчные протоки	2	2	0
C23	Желчный пузырь	1	0	1
C25	Поджелудочная железа	9	8	1
C31	Придаточные пазухи	1	1	0
C32	Гортань	4	4	0
C34	Бронхи, легкое	20	17	3
C43	Злокачественная меланома	4	3	1
C44	Другие злокачественные новообразования кожи	9	7	2
C48	Забрюшинное пространство и брюшина	1	0	1
C50	Молочная железа	23	–	23
C53	Шейка матки	9	–	9
C54	Тело матки	2	–	2
C56	Яичник	3	–	3
C57	Другие женские половые органы	1	–	1
C61	Предстательная железа	7	7	–
C64	Почка	8	6	2
C67	Мочевой пузырь	8	7	1
C68	Другие мочевые органы	1	1	0
C71	Головной мозг	2	2	0
C78	Вторичное ЗНО органов дыхания и пищеварения	1	1	0
C80	ЗНО без уточнения локализации	5	2	3
C81	Лимфома Ходжкина	1	1	0
C83	Неходжкинская лимфома диффузная	2	2	0
C85	Другие неходжкинские лимфомы	3	2	1
C91	Лимфоидный лейкоз	3	3	0
C94	Другой уточненный лейкоз	2	1	1
D06	Карцинома <i>in situ</i> шейки матки	2	–	2
ВСЕГО		194	127	67

Таблица 6

Наблюдаемое и ожидаемое число случаев ЗНО у мужчин в возрасте 35 лет и старше, переболевших сифилисом в 1976–1986 гг. в г. Москве. SIR и их 95%-ные ДИ

Локализация ЗНО	Наблюдаемое	Ожидаемое	SIR	95%-ный ДИ
Все опухоли	127	187,2	0,7*	0,6–0,8
ЗНО губы, полости рта и глотки	12	12,5	0,95	0,5–1,7
в т.ч. языка	6	2,1	2,9*	1,05–6,3
ЗНО пищевода	8	5,4	1,5	0,6–2,9
ЗНО желудка	9	24,8	0,4*	0,2–0,7
ЗНО толстой и прямой кишки	21	22,5	0,9	0,6–1,4
ЗНО печени и желчевыводящих путей	2	3,7	0,54	0,1–1,9
ЗНО поджелудочной железы	8	6,8	1,2	0,5–2,3
ЗНО гортани	4	6,4	0,6	0,2–1,6
ЗНО легкого	17	37,3	0,5*	0,3–0,7
ЗНО мужских половых органов**	7	12,9	0,5	0,2–1,1
ЗНО кожи, вкл. меланому	10	12,8	0,8	0,4–1,4
ЗНО почки и мочевого пузыря	13	14,8	0,9	0,5–1,5
ЗНО ЦНС	2	2,6	0,8	0,1–2,8
Гемобласты	9	8,1	1,1	0,5–2,1

*различия статистически достоверны; **предстательная железа, половой член, яичко

Таблица 7

Наблюдаемое и ожидаемое число случаев ЗНО у женщин в возрасте старше 35 лет, переболевших сифилисом в 1976–1986 гг. в г. Москве. SIR и их 95%-ные ДИ

Локализация ЗНО	Наблюдаемое	Ожидаемое	SIR	95%-ный ДИ
Все опухоли	64	139,4	0,5*	0,4–0,6
ЗНО желудка	3	9,2	0,3	0,1–1,0
ЗНО толстой и прямой кишки	7	14,9	0,5	0,2–1,0
ЗНО печени и желчевыводящих путей	1	1,9	0,5	0,02–2,9
ЗНО поджелудочной железы	1	2,8	0,4	0,01–2,0
ЗНО легкого	3	3,8	0,8	0,2–2,3
ЗНО кожи, вкл. меланому	3	10,6	0,3*	0,1–0,8
ЗНО молочной железы	22	40,3	0,6*	0,3–0,8
ЗНО женских половых органов **	13	29,3	0,4*	0,2–0,8
ЗНО почки и мочевого пузыря	3	4,5	0,7	0,1–2,3
Гемобластозы	2	5,1	0,4	0,1–1,7

*различия статистически достоверны; **шейка матки, тело матки, яичник.

Таблица 8

Наблюдаемое и ожидаемое число смертей от ЗНО по локализациям среди мужчин, переболевших сифилисом в 1976–1986 гг. в г. Москве. SMR и их 95%-ные ДИ

Локализация ЗНО	Наблюдаемое	Ожидаемое	SMR	95%-ный ДИ
Все опухоли	92	164,8	0,6*	0,5–0,7
ЗНО губы, полости рта и глотки	10	9,5	1,1	0,5–1,9
ЗНО пищевода	8	6,0	1,3	0,6–2,6
ЗНО желудка	9	26,4	0,3*	0,2–0,6
ЗНО ободочной и прямой кишки	14	18,8	0,7	0,4–1,2
ЗНО гортани	2	5,8	0,4	0,04–1,2
ЗНО легкого	16	43,2	0,4*	0,2–0,6
ЗНО кожи, вкл. меланому	5	2,5	2	0,6–4,6
ЗНО мужских половых органов**	4	6,3	0,6	0,2–1,6
Гемобластозы	2	9,1	0,2*	0,03–0,8
ЗНО мочевыводящих путей	7	10,4	0,7	0,3–1,4

*различия статистически достоверны; **предстательная железа, половой член, яичко

Таблица 9

Наблюдаемое и ожидаемое число смертей от ЗНО по локализациям среди женщин, переболевших сифилисом в 1976–1986 гг. в г. Москве. SMR и их 95%-ные ДИ

Локализация ЗНО	Наблюдаемое	Ожидаемое	SMR	95%-ный ДИ
Все опухоли	34	80,5	0,4*	0,3–0,6
ЗНО желудка	3	9,5	0,3*	0,07–0,92
ЗНО ободочной и прямой кишки	3	11,2	0,3*	0,06–0,8
ЗНО легкого	2	4,5	0,5	0,05–1,6
ЗНО кожи, вкл. меланому	1	1,6	0,6	0,02–3,6
ЗНО молочной железы	10	18,5	0,5	0,3–1,0
ЗНО женских половых органов**	7	14,2	0,5	0,2–1,0
Гемобластозы	1	4,8	0,2	0,01–1,2
ЗНО мочевыводящих путей	1	2,3	0,4	0,01–2,4

*различия статистически достоверны; **шейка матки, тело матки, яичник

Таблица 10

Возрастные показатели общей смертности (от всех причин) и их стандартные ошибки в когорте больных сифилисом и в популяции на 100 000 человеко-лет наблюдения в 1988–2007 гг. в г. Москве

Возраст (лет)	Смертность от всех причин на 100 000 человеко-лет наблюдения			
	Мужчины		Женщины	
	Когорта	Все население	Когорта	Все население
35–39	885 ± 105	563 ± 3	289 ± 66	174 ± 2
40–44	1495 ± 121	820 ± 3	527 ± 80	264 ± 2
45–49	1657 ± 129	1182 ± 4	627 ± 90	393 ± 2
50–54	1944 ± 152	1656 ± 5	744 ± 109	562 ± 3
55–59	3160 ± 236	2292 ± 7	1356 ± 181	830 ± 4
60–64	4091 ± 336	3194 ± 9	1332 ± 222	1251 ± 5
65–69	4338 ± 432	4360 ± 12	2225 ± 339	2014 ± 6
70–74	6842 ± 775	5824 ± 17	3561 ± 578	3353 ± 9
75–79	6664 ± 1067	8214 ± 25	4211 ± 826	5691 ± 13
80–84	9848 ± 1931	11962 ± 42	6170 ± 1543	9822 ± 21
85+	11791 ± 2948	18415 ± 69	7092 ± 2138	18491 ± 37

Результаты

В табл. 3 представлена демографическая характеристика когорты больных сифилисом с распределением по полу и возрасту. Средний возраст мужчин, заболевших сифилисом, составил 33,5 года, женщин – 32 года.

Заболеваемость ЗНО

В табл. 4 представлены аналогичные данные для членов когорты, заболевших ЗНО за период 1988–2007 гг. Средний возраст заболевания у мужчин составил 59 лет, у женщин – 57 лет.

Как для мужчин, так и для женщин включены случаи ЗНО, зарегистрированные в возрасте 35 лет и старше, за период 1988–2007 гг. (127 у мужчин и 67 у женщин). Распределение по локализациям случаев ЗНО, диагностированных у членов когорты, представлено в табл. 5.

Наблюдаемое и ожидаемое число заболевших ЗНО за 1988–2007 гг. по полу и локализации, стандартизованные отношения заболеваемости с 95% доверительными интервалами представлены в табл. 6 и 7. Общая заболеваемость ЗНО у больных сифилисом оказалась достоверно ниже, чем в популяции как у мужчин ($SIR=0,7$; ДИ 0,6–0,8), так и у женщин ($SIR=0,5$; ДИ 0,4–0,6). Кроме того, достоверно более низкой оказалась заболеваемость раком желудка ($SIR=0,4$; ДИ 0,2–0,7) и раком легкого у мужчин ($SIR=0,5$; ДИ 0,3–0,7) и ЗНО молочной железы ($SIR=0,6$; ДИ 0,4–0,9), кожи ($SIR=0,3$; ДИ 0,1–0,8) и половых органов у женщин ($SIR=0,4$; ДИ 0,2–0,8). Мужчины, заболевшие сифилисом, достоверно чаще заболевали ЗНО языка ($SIR=2,9$; ДИ 1,1–6,3). На границе достоверных различий заболеваемость колоректальным раком у обоих полов. В силу малого числа случаев достоверных различий для других локализаций установить не удалось.

Смертность от ЗНО

Из 5791 больных сифилисом за период наблюдения умерло от всех причин 1567 человек. Из них 1562 умерло за период 1988 по 2007 гг., в том числе 127 – от злокачественных опухолей. Как и для заболеваемости, при расчете стандартизованных отношений смертности учитывались смерти от ЗНО в возрастных группах старше 35 лет за календарный период 1988–2007 гг. (126 случаев).

Наблюдаемое и ожидаемое число умерших от ЗНО среди когорты по полу и локализации за 1988–2007 гг., стандартизованные отношения смертности и их 95% доверительные интервалы представлены в таблицах 8 и 9. Как и заболеваемость, смертность от всех ЗНО у больных сифилисом оказалась достоверно ниже, чем в популяции как у мужчин ($SMR=0,6$; ДИ 0,5–0,7), так и у женщин ($SMR=0,4$; ДИ 0,3–0,6). Достоверно более низкой оказалась также смертность мужчин от рака желудка ($SMR=0,3$; ДИ 0,2–0,7), рака легкого ($SMR=0,4$; ДИ 0,2–0,6) и гемобластозов ($SMR=0,2$; ДИ 0,03–0,8). У женщин достоверные различия установлены для колоректального рака ($SMR=0,3$; ДИ 0,06–0,8) и рака желудка ($SMR=0,3$; ДИ 0,07–0,92), на границе достоверности различия в смертности от рака молочной железы и опухолей женских половых органов. Для других локализаций вследствие малого числа наблюдений достоверных различий не обнаружено. Кроме того, учитывая высокую общую смертность среди больных сифилисом, можно предположить, что часть больных не дожила до онкологического диагноза.

Сравнительный анализ показал, что смертность от всех причин среди больных сифилисом достоверно выше, чем в населении в целом: SMR общей смертности в возрасте 35 лет и старше составляет 1,3 (1,3–1,4) у мужчин и 1,4 (1,3–1,5) у женщин. При этом, как видно из табл. 10, наиболее значительные различия наблюдаются в возрастных группах от 35 до 50 лет.

Обсуждение

В исследовании проведен ретроспективный многолетний анализ многочисленной когорты людей обоего пола, заболевших сифилисом и лечившихся от него по общепринятой методике в период с 1 января 1976 г. по 31 декабря 1986 г. в одном специализированном стационаре – ГКБ № 14 г. Москвы. Полученные данные ответили на поставленный вопрос о частоте развития ЗНО у мужчин и женщин, которые заразились сифилисом и лечились от него с использованием антибактериальных препаратов пенициллинового ряда. Отмечено, что мужчины, заболевшие сифилисом, достоверно чаще заболевали раком языка ($SIR=2,9$; ДИ 1,1–6,3). Эти результаты, хотя и трудно объяснимые, не противоречат данным более ранних работ [45]. Очевидно, что сифилис не является единственным фактором индукции или стимуляции развития опухоли. Не вызывает сомнения, что большинство больных сифилисом ведут рискованный образ жизни, включающий злоупотребление крепкими алкогольными напитками, табакокурение, употребление наркотиков, большое число половых партнеров с включением орального секса, повышение вероятности заболеть другими инфекционными заболеваниями, передающимися половым путем и др. Мы не располагаем данными о перечисленных факторах риска развития рака языка у лиц исследуемой группы, поэтому не можем делать выводы о вкладе этих факторов в развитие ЗНО языка в нашем исследовании. Несомненно, развитие ЗНО языка связано с суммарным эффектом перечисленных факторов риска, где роль сифилиса может быть незначительной или вообще не иметь никакого значения.

В аналогичном исследовании (1994 г.) из шт. Нью-Йорк (США) установлено статистически значимое повышение заболеваемости для саркомы Капоши [45].

В нашем исследовании такие данные не получены, возможно, из-за низкой распространенности данного заболевания в тот период времени в Москве.

С другой стороны, нами получены данные, что у лиц перенесших сифилис как мужчин, так женщин, в целом без учета локализаций, достоверно (95%) реже диагностируются ЗНО. Достоверное (95%) снижение заболеваемости по отдельным локализациям ЗНО: у мужчин – рак желудка и легкого; у женщин – рак молочной железы; рак кожи, включая меланому; рак женских половых органов (шейка и тело матки, яичники).

Выявлено значительное снижение заболеваемости ЗНО: у мужчин – мужских половых органов (предстательная железа, яичко); у женщин – желудка, ободочной и прямой кишки, однако различия статистически не достоверны.

Ограничением для результатов исследования является тот факт, что ввиду отсутствия канцеррегистра в г. Москве с 1976 по 1985 гг. невозможно установить возникновение или отсутствие ЗНО у больных сифилисом за указанный период.

В целях оценки степени ограничения результатов нами параллельно был проведен анализ для подкогорты заболевших сифилисом за период 1985–1986 гг. (1094 больных, 21965 человеко-лет наблюдения за период 1988–2007 гг.). Несмотря на небольшой период наблюдения для подкогорты был получен аналогичный статистически достоверный результат: наблюдаемое число случаев заболевания ЗНО у мужчин – 22, ожидаемое число случаев – 46,6 ($SIR = 0,5$; $DI = 0,3–0,7$).

Полученные результаты согласуются с небольшим числом работ, которые высказываются в пользу наличия антагонизма между сифилисом и ЗНО [11; 40; 49].

В опубликованной литературе описаны примеры антагонизма между микроорганизмами и ЗНО [4; 6].

Так, еще в XVIII веке ряд врачей поделились клиническими наблюдениями, что случайное заражение больных саркомой рожистым воспалением иногда ведет к исчезновению опухоли. Тогда же были сделаны попытки искусственного заражения стрептококком и стафилококком больных с различными опухолями. Рядом авторов были описаны случаи благоприятного эффекта этого лечебного приема при саркомах. Однако наблюдались и осложнения от рожы со смертельным исходом. Опасность такого способа лечения натолкнула на мысль о применении вместо живых микробов их токсинов. Метод применения фильтратов культур β -гемолитического стрептококка группы А и *bac. prodigiosus* был разработан W.B. Coley [33]. В 1914 г. он подвел итоги 25-летнего применения этого метода лечения: из 710 больных с неоперабельными опухолями (почти исключительно саркомами) было получено выздоровление у 80 человек. Из этого числа 43 оставались здоровы через 5 и больше лет. У значительного количества больных имело место существенное улучшение. Отмечено 3 смертельных исхода, непосредственно связанные с лечением и зависевшие, по-видимому, от впрыскивания токсинов в просвет сосудов [8].

Дальнейшие клинические наблюдения привели W.B. Coley к выводу, что наиболее благоприятный терапевтический эффект токсины упомянутых микробов дают при костных саркомах.

В 1933 г. он опубликовал данные о лечении этим методом свыше 500 больных с саркомами длинных трубчатых костей. Благоприятные результаты были получены как при лечении неоперабельных больных, например, при множественных миеломах, саркомах Юинга, так и при профилактике рецидивов после произведенной операции или лучевой терапии. Автор пришел к заключению, что профилактическое применение токсинов после ампутаций по поводу остеогенных сарком в два и более раза увеличивает число больных, живущих более 5 лет после операции.

Работы W.B. Coley дали толчок к изучению действия на опухоли ряда других бактериальных продуктов. Так, например, применялись токсины бактерий *Coli*-группы, тифа и паратифа, стафило- и стрептококков, продукты *bac. histolyticus*, *bac. prodigiosus*, гонококков. Ряд исследователей дали положительную оценку их действия на опухоли в экспериментах на животных, однако не все смогли этого подтвердить.

В 1912 г. N. DePace описал случай ремиссии рака шейки матки у женщины, вакцинированной против бешенства после укуса собаки [34]. Позднее C. Lavidit и P. Haber подтвердили этот феномен *in vitro*, наблюдая гибель опухолевых клеток в результате инфицирования их вирусами [42].

Были сделаны попытки применения при опухолях туберкулина. В частности, Имамура в 1937–1938 гг. сообщил, что инъекции туберкулина приводят к задержке роста различных перевиваемых опухолей у крыс и кроликов. Пирл с сотрудниками описали уменьшение размеров опухолей и удлинение жизни 7 иноперабельных больных с ЗО, получавших инъекции туберкулина. Однако Гольмгрен наблюдал при этом лечении лишь субъективное улучшение.

В 1976 г. Morales и соавт. впервые опубликовали данные об эффективности внутрипузырного применения вакцины БЦЖ при поверхностном раке мочевого пузыря. С тех пор во многих клинических исследованиях была подтверждена высокая противоопухолевая активность вакцины БЦЖ в отношении поверхностного переходноклеточного папиллярного рака и рака *in situ*. В настоящее время многие авторы считают, что сочетание ТУР с профилактической внутрипузырной иммунотерапией вакциной БЦЖ является «золотым стандартом» лечения поверхностного рака мочевого пузыря. Механизм противоопухолевого действия вакцины БЦЖ до конца не изучен.

Показано, что БЦЖ не обладает прямым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, а при введении вакцины в мочевой пузырь развивается воспалительная и местная иммунная реакция. Считается, что для развития противоопухолевого действия БЦЖ необходимо присутствие CD8 цитотоксических лимфоцитов и CD4 клеток-хелперов. В моче появляются некоторые цитокины: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, TNF, гамма-интерферон [25].

В 1952 г. А.Е.Моог впервые обнаружил способность некоторых вирусов лизировать опухолевые клетки (онколитические свойства вирусов) [46]. Эти наблюдения послужили поводом для экспериментальных и клинических исследований с целью использования вирусного онколизиса в практике [21]. Однако до настоящего времени широкого использования в клинике эта концепция не нашла.

Более 70 лет назад Г.В. Роскин с соавторами сообщили об обнаружении ими антагонизма между болезнью Чагаса и злокачественным ростом, механизмом которого являлась способность возбудителя болезни – жгутикова простейшего *Trypanozoma cruzi* подавлять развитие опухолей.

На основе этого феномена было создано два противоопухолевых препарата: «Круцин» – в России и «Трипанозома» – во Франции [6]. Однако по различным причинам широкого клинического применения эти препараты не нашли.

Влияние инфекций на клиническое течение лейкозов изучалось в 1970 гг. И.А. Кассирским. Было отмечено, что в одних случаях инфекции являлись причиной гибели больного лейкозом, в других – приводили к развитию ремиссий. Из 109 больных острым лейкозом у 25 течение основного заболевания осложнилось воспалительными процессами (пневмония – 6, абсцессы ягодиц – 5, парaproктиты – 3, остеомиелиты – 2 и другие – фурункулы лица, абсцессы мягких тканей верхних и нижних конечностей, гнойный лимфаденит, тромбофлебит, туберкулез легких).

У 15 больных наступила клинико-гематологическая ремиссия, чаще всего – длительностью от 2 до 6 мес. Однако в одном случае ремиссия продолжалась 2 года и в одном – 12 лет. К сожалению, малочисленность проведенных бактериологических исследований (8 из 15) не позволила выделить преимущественность какой-либо микрофлоры [7].

Некоторые авторы полагают, что ремиссии при остром лейкозе наступали после воспалений и инфекций, вызванных стрептококком; в частности, одним из токсинов стрептококка – стрептолизина, что позволило предположить в качестве механизма воздействия на лейкемический процесс цитолитическим эффектом микробных токсинов на лейкозные клетки.

В 1978 г. ветеринар из г. Владивостока В. Бритов заметил, что домашние животные, болеющие кишечной инфекцией – трихинеллезом, никогда не болеют раком. Он сделал вывод, что «трихинеллы, каким-то образом препятствуют развитию в организме раковых клеток».

Этот феномен был подтвержден в эксперименте на крысах. В результате дальнейшей работы появилась «вакцина Бритова», действие которой было проверено на больных с различными ЗО. Сторонники «вакцины Бритова» отмечали выраженную противоопухолевую эффективность. Однако у больных, получавших подобное лечение, возник трихинеллез в тяжелой форме [51].

Подводя итоги попыткам токсинотерапии ЗО, нужно сказать, что этот путь имеет определенные перспективы. Токсины, выделяемые некоторыми микробами, уже в минимальных концентрациях действуют на процессы клеточного обмена у высших организмов и притом часто обладают избирательным влиянием лишь на определенные клеточные группы (например, на нервные клетки, соединительнотканые и др.). Нет ничего невероятного в том, что некоторые токсины могут оказывать преимущественное влияние на ткани, находящиеся в процессе пролиферации, действуя, например, на ферментные системы, имеющие особенно большое значение в процессе клеточного роста и размножения.

Механизм приобретенного «противоопухолевого иммунитета» у больных сифилисом не совсем ясен. Известно, что сифилис, возбудителем которого является *Treponema pallidum*, – системное инфекционное заболевание, передающееся в основном половым путем, с характерным чередованием обострений и периодов скрытого течения. Бледная трепонема быстро проникает в организм через слизистые оболочки и мелкие повреждения кожи и спустя уже несколько часов достигает кровеносных и лимфатических сосудов. Как правило, через 3 нед. инкубационного периода в месте внедрения возбудителя развивается твердый шанкр, который держится от 2 до 6 нед., в сочетании с регионарным лимфаденитом. Бактериemia и метастатические очаги инфекции развиваются во время инкубационного периода. Сифилисом заражаются 30–50 % половых партнеров больных первичным и вторичным сифилисом. При однократном половом контакте риск заражения еще ниже.

Через определенное время развивается вторичный сифилис, проявляющийся генерализованными высыпаниями и лимфаденитом. Вторичный сифилис сменяется латентным, который продолжается много лет. У 30 % больных, не получавших лечения, возникает третичный сифилис, характеризующийся деструктивным поражением кожи, слизистых, опорно-двигательного аппарата, внутренних органов, крупных сосудов, ЦНС.

При сифилисе образуются два типа антител – к кардиолипину антигену (липидам, которые имеются как в клеточной стенке бледной трепонемы, так и тканях микроорганизма) и к специфическому трепонемному антигену. Развитие иммунитета при заражении сифилисом зависит от степени

антигенной стимуляции, которая определяется количеством внедрившихся возбудителей и временем, прошедшим от момента заражения до начала лечения. Роль гуморального иммунитета в защите от сифилиса окончательно не выяснена.

Доказано, что наружная мембрана бледной трепонемы содержит мало белков. Сравнительно недавно был обнаружен поверхностный белок – порин, обладающий антигенными свойствами. Невозможность выращивания бледной трепонемы в культуре затрудняет изучение ее антигенов [10]. Антитела к кардиолипину антигену не являются протективными, хотя и участвуют в опсонизации бледной трепонемы.

Основную роль в заживлении твердого шанкра и сдерживании инфекции играет клеточный иммунитет. Инфильтрат твердого шанкра представлен Т-лимфоцитами и макрофагами. Т-лимфоциты, сенсibilизированные к трепонемному антигену, появляются на ранних стадиях заболевания. Среди лимфоцитов CD4, инфильтрирующих твердый шанкр и сифилиды, преобладают Т-хелперы типа 1; секретируемые ими цитокины активируют макрофаги. АТ к трепонемному антигену усиливают фагоцитоз и способствуют уничтожению бледной трепонемы макрофагами [10].

Известно, что и противоопухолевый иммунитет основан на T_H1 -зависимом клеточном иммунном ответе, активирующем цитотоксические Т-лимфоциты, макрофаги и др. Т-лимфоциты распознают и уничтожают опухолевые клетки с использованием таких механизмов как экзоцитоз гранул, содержащих цитотоксические эффекторные молекулы перфорин и гранзимы и секреции фактора некроза опухолей. Роль гуморального противоопухолевого иммунного ответа невелика [5; 17]. Скорее всего, звенья активированного клеточного иммунитета у больных сифилисом могут служить препятствием развития злокачественных опухолей у ряда больных. Вероятно, что у заболевших сифилисом образуются и иные факторы, которые предотвращают развитие злокачественных опухолевых клеток. Этот вопрос требует специального изучения.

Тем не менее, полученные результаты служат основанием для начала работы по созданию профилактической противоопухолевой вакцины для ряда локализаций на основе компонентов бледной трепонемы.

Заключение

Обнаруженная более низкая заболеваемость и смертность от некоторых злокачественных опухолей у больных сифилисом по сравнению с общей популяцией может быть обусловлена приобретением соответствующего иммунного статуса.

Полученные результаты могут служить основанием для начала экспериментальных работ по созданию профилактической противоопухолевой вакцины для ряда локализаций на основе компонентов бледной трепонемы.

Авторы выражают благодарность за содействие в выполнении данного исследования С.В. Полякову, первому заместителю руководителя Департамента Здравоохранения г. Москвы, работникам городского канцелярия г. Москвы в лице О.А. Ядыкова; отделу адресно-справочной работы и информационных ресурсов УФС России по г. Москве в лице начальника отдела С.А. Плешаковой; управлению ЗАГС г. Москвы в лице начальника управления И.Н. Муравьевой.

Литература

1. Быкова В.П., Абрамова Е.И., Гробов А.О. Случай вторичного сифилиса, симулировавшего плазмцитоз // Архив патологии. – 1991. – Т. 53, № 8. – С. 59–61.
2. Викторов И.Л. Сифилитическое поражение желудка в практике онкодиспансера. В сб.: Современные вопросы медицины, 1998. – Т. 2. – С. 92–3.
3. Заридзе Д.Г. Эпидемиология и этиология злокачественных новообразований. В кн.: Д.Г. Заридзе (ред.). Канцерогенез. – М.: Медицина, 2004. – С. 29–85.
4. Затула Д.Г. Микроорганизмы, рак и противоопухолевый иммунитет. К.: Наукова думка, 1985. – 213 с.
5. Иммунология и аллергология/Под ред. Воробьева А.А., Быкова А.С., Караулова А.В. – М.: ПМ, 2006. – 287 с.
6. Калининкова В.Д. Противоопухолевые свойства жгутикового простейшего *Trypanosoma cruzi*. – Тула: Гриф и К., 2004. – 280 с.
7. Кассирский И.А., Алексеев Г.А. Клиническая гематология. М.: Медицина, 1970. – С. 465–8.
8. Ларионов Л.Ф., Манкин З.В. Биологические и химические способы лечения рака. В кн.: Н.Н.Петров (ред.). Злокачественные опухоли. – М.: Медгиз, 1948. – Т. 1. – С. 117–52.
9. Легостаев В.М. Эндоскопическая дифференциальная диагностика рака желудка и опухолеподобной формы гастросифилиса. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2004. – 196 с.
10. Лукхарт Ш., Холмс К. Сифилис. В кн.: Внутренние болезни по Тинсли Р. Харрисону. – Книга 1, Раздел 9. – М.: Практика, 2002. – С. 1249–62.
11. Мгалоблишвили Г.Н. Сифилис и рак гортани по материалам ЛОР-отделения за 19 лет (1946 – 1965). В сб.: Некоторые вопросы современной онкологии. – Тбилиси. 1974. – С. 61–3.
12. Милич М.В. Эволюция сифилиса. 2-е издание. – М.: Медицина, 1987. – 160 с.
13. Новинская Л.Д. Рак и туберкулез легкого у больного сифилисом. Юбилейный сборник научных работ, посвященный 40-летию Великой октябрьской социалистической революции, М.: Медгиз, 1958. – С. 233–5.
14. Пискалова Т.П., Парфенов С.В., Рудных Н.И. К вопросу о тактике ведения больных с сочетанием вторичного сифилиса и рака желудка // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2000. – № 4 – С.58–9.
15. Попов И.С. Сифилис и рак // Врачебное дело. – 1945. – № 9–10. – С. 469.
16. Рабен А.С., Мацейна С., Лорие Ю.И. Случай вторичного рецидивного сифилиса, ошибочно диагностированного как лимфогранулематоз // Клини. Мед. – 1970. – Т. 48, № 10. – С. 97–9.
17. Рабсон А., Ройт А., Делвз П. Основы медицинской иммунологии: Пер. с англ. – М.: Мир, 2006. – 320 с.
18. Раскольцев К.В. Ганглионевринома у новорожденного ребенка с ранним врожденным сифилисом // Архив патологии. – 2005. – Т. 67, № 1. – С. 42–4.
19. Рысс Е.С. Редкие заболевания желудка // С-Петербург. Врачебные ведомости. – 1994. – № 7. – С. 27–34.
20. Саттон Л. Профилактика и ранняя диагностика онкологических заболеваний. Общая врачебная практика по Джону Нобелю. – М.: Практика, 2005. – С. 1060.
21. Сиванандохам М., Уоллек М.К. В кн.: Вирусные онколизаты. ДеВита В.Т., Хеллман С., Розенберг С.А. (ред.). Биологические методы лечения онкологических заболеваний. – М.: Медицина, 2002. – С. 678–86.
22. Тарновский В. Предисловие от редактора. В кн.: Э. Лансеро Учение о сифилисе: Пер. с франц. – Т.2. – СПб.: Гл. военно-медицинское управление, 1867. – С. I–VIII.
23. Тихомирова Н.В. Два случая твердого шанкра прямой кишки // Вестн. дерматологии и венерологии. – 1997. – №2. – С. 70–1.
24. Федоров Ю.П., Фаенсон В.Е., Ометов В.К. Поражение желудка при вторичном рецидивном сифилисе // Вестник дерматологии. – 1985. – № 11. – С. 68–70.
25. Фигурин К.М. Рак мочевого пузыря. В кн.: М.И.Давыдов (ред.) Энциклопедия клинической онкологии. – М.: ООО «РЛС-2004», 2004. – С. 500–15.
26. Фракасторо Д. О сифилисе: Пер. с латин. – М.: Медгиз, 1956. – 99 с.
27. Худякова К.П. Сифилис и рак // Вестник рентгенологии и радиологии. – 1935. – Т. XIV. – С. 236–44.
28. Шапиро Я.Е. Хронические инфекции (ревматизм, люис, туберкулез) и рак // Тер. Архив. – 1934. – Т. 12, № 5. – С. 23–40.
29. Belote G.H. The association of the carcinoma of the tongue and syphilis // JAMA. – 1930. – Vol. 94 – P.1985.
30. Belote G.H. The association of cancer and syphilis as determined by positive serology // Am. J. Syph. – 1931. – Vol. 15. – P. 372.
31. Breslow N.E., Day N.E. Statistical Methods in Cancer Research. The Design and Analysis of Cohort Studies. – Vol. II. – Lyon. – IARC. – 1987. – 406 p.
32. Cary N.A. Frequency of syphilis with cancer of the lips, tongue and buccal mucous membrane // JAMA. – 1920. – Vol. 75. – P. 858.
33. Coley W.B. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxin (the mixed toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigious) // London: John Bale, Sons & Danielsson, Ltd. – 1909.
34. De Pace N. Gynecologia – 1912. – P. 9–82. Цит. По кн.: В. Т. ДеВита, С. Хеллман, С. А. Розенберг (ред.). Биологические методы лечения онкологических заболеваний. – М.: Медицина, 2002. – 685 с.
35. Esmarch Fr. Aphorismen ub. Krebs // Arch. f. Klin. Chir. – 1872. – Bd. XXII. – P. 455.
36. Fournier M. Sur la curabilité du cancer eu generale, et la traitement du cancer de la langue en particulier // Bull. Acad. de med. – 1906. – Vol. 56. – 3 serie. – № 40. – P. 464.
37. Frisch M., Jorgensen B.B., Friis S., Melbet M. Syphilis and the risk of penis cancer // Sex Transm Dis. – 1996. – Vol. 4, № 6. – P.471.
38. Fry H. J. B. Syphilis and malignant disease. A serological study // J. Hyg. – 1929. – Vol. 29. – P. 313.
39. Harding G.W.II The influence of syphilis in cancer of the cervix uteri // Cancer Res. – 1942. – № 2. – P. 59.
40. Lancereaux E. Traite historigue et pratigue de la Syphilis .Paris Lib. Germer bailliere. 1873. – 605 p.
41. Lang E. Лекции по патологии и терапии сифилиса: Пер. с нем.. – СПб., 1886. – 529 с.
42. Lavidit C., Haber P. Recherches sur le virus de la peste aviaire pathogene pour la souris. Ses affinities pour les neoplasmes // Rev. Immunol. – 1937. – Vol. 3 – P. 5–11.
43. Levin M.L., Kress L.C., Goldstein H. Syphilis and Cancer // New York St. J. Med. – 1942. – Vol. 42 – P. 18.
44. Lund C.C. Syphilis in relation to cancer of the buccal mucosa // New Engl. J. Med. – 1933. – Vol. 209. – P. 131.
45. Michalek A.M. Historical and Contemporary Correlates of Syphilis and Cancer // International Journal of Epidemiology. – 1994. – Vol. 23, № 2. – P. 381–5.
46. Moore A.E. Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumors // Ann. NY Acad. Sci. – 1952. – Vol. 54. – P. 945–52.
47. Ozols R.F. Успехи клинической онкологии 2006: Наиболее значимые достижения в лечении, профилактике и скрининге онкологических заболеваний. Сообщение американского общества клинической онкологии // J. Clin. Oncol. – 2007. – Vol. 25, № 1. – P. 165–82.
48. Rojel J. The interrelation between uterina cancer and syphilis. A patho - demografic study. Copenhagen: Busck, 1953. – 82 p.
49. Thom B. P. Syphilis, Chapters: XX – Malignant Growths, XXX – Syphilis and malignant disease. Philadelphia: NY. Lea and Febiger, 1922. – P. 249–51, P. 336–40.
50. zur Hausen H. Infections Causing Human Cancer Weinheim: Wiley-VCH Verlag Gmbn end Co .KGaA, 2006. – 517 p.
51. <http://vaccine1.narod.ru/> (дата обращения: 14.07. 2007).

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

И.С. Давиденко

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ГУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1», г. Краснодар

Контактная информация:

Давиденко Ирина Сергеевна, зав. отделением химиотерапии ГУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1»

адрес: 350040, г. Краснодар, ул. Димитрова, 146; тел. +7(8612)33-67-12

e-mail: irina_dav@mail.ru

Статья поступила: 15.03.2010, принята к печати 00.00.0000.

УДК 618.19-006.6-091

I. КЛИНИЧЕСКАЯ И МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ T₁N₀M₀

Резюме

Изучены характеристики опухоли молочной железы, определяющие вероятность прогрессирования процесса у больных с клинически ранним раком. Показана необходимость полноценной морфо-биологической верификации опухоли для определения показаний по проведению комплексного лечения при РМЖ T₁N₀M₀.

Ключевые слова: рак молочной железы, рецепторный статус, биологические особенности.

I.S. Davidenko

CLINICAL AND MORPHO-BIOLOGICAL BREAST CANCER T₁N₀M₀ CHARACTERISTICS

State Medical Institution «Clinical Oncology Dispensary № 1» under Krasnodar region Healthcare department

Abstract

In this work breast tumor characteristics defining the tumor progression probability in patients with clinically early stage cancer are studied. We also discuss the necessity of full tumor morpho-biological verification is shown for complex breast cancer T₁N₀M₀ treatment.

Key words: breast cancer, receptor status, biological features.

Введение

Рак молочной железы является наиболее часто встречающимся онкологическим заболеванием у женщин: им болеют 8–9 % лиц женского пола в развитых странах мира [13]. При этом пятилетняя выживаемость больных с распространенными формами РМЖ не превышает 19 % [4]. В России ежегодно регистрируется около 50 тысяч женщин с впервые установленным диагнозом РМЖ [1]. В Российской Федерации темп прироста заболеваемости за 10 лет составил 18,5 % [2]. Прирост заболеваемости РМЖ по Краснодарскому краю за последние 10 лет составил 14,8 % (1999 г. – 62,8 и в 2008 г. – 72,1 на 100 000 взрослого женского населения) [2]. Высокие показатели заболеваемости и смертности от рака молочной железы обуславливают необходимость поиска новых видов терапии, в том числе лекарственной.

Достижения последних лет в области молекулярной биологии позволили узнать некоторые особенности фенотипа опухоли, к которым относятся: индукция опухолью сигналов роста, высокий уровень репликативного потенциала, резистентность к рост-ингибиторным сигналам, уклонение от апоптоза, ангиогенез, тканевая инвазия и метастазирование. Известны прогностические факторы РМЖ, которые особенно актуальны при отсутствии метастатического поражения: наличие на поверхности опухоли эстроге-

новых и прогестероновых рецепторов, ответственных за деление опухолевых клеток ErbB2 рецепторов, рецепторов стимулирующих апоптоз (p53, Bcl-2, Вах и др.) и ангиогенез (VEGF), отвечающих за показатели пролиферативной активности (Ki-67) и др. [10; 12]. Повышенная экспрессия ErbB2 отмечается примерно в 30 % случаев РМЖ, и является независимым маркером неблагоприятного прогноза. Повышенная экспрессия ErbB2 приводит к снижению эффективности химио- и эндокринотерапии РМЖ. Доказано, что гиперэкспрессия HER-2/neu в опухоли повышает риск рецидива опухолевого процесса в несколько раз по сравнению с отсутствием гиперэкспрессии в опухоли [7; 14]. Данная форма рака характеризуется агрессивным течением, ранним метастазированием, в том числе в головной мозг (частота метастазов в ЦНС 25–34 %) [3; 5; 8; 15; 17]. Прогноз для пациенток с обнаруженными отдаленными метастазами РМЖ неблагоприятен, уровень однолетней выживаемости у них не превышает 20 % [9; 16].

Результаты проведенных клинических исследований свидетельствуют о том, что нередко при РМЖ на молекулярном уровне пересекаются сигнальные пути HER2/neu и VEGF, что, в конечном счете, усугубляет процесс прогрессии опухоли. Гиперэкспрессия VEGF часто сочетается в клетках опухоли молочной железы с повышенной экспрессией HER2/neu, что обуславливает агрессивность течения опухолевого процесса [6; 11].

Цель исследования – изучение факторов, предопределяющих необходимость комплексного лечения больных с РМЖ $T_1N_0M_0$.

Материалы и методы

Проанализированы гистологические и морфо-биологические особенности карцином у 148 пациенток, страдавших РМЖ, с наибольшим размером опухоли до 2 см (T_1) и отсутствием регионарных и отдаленных метастазов (N_0M_0).

Для постановки диагноза проводили стандартные методы инструментального и лабораторного обследования.

Всем больным было проведено хирургическое лечение в объеме радикальной резекции или радикальной мастэктомии с последующим морфологическим и иммуногистохимическим исследованием опухолей молочной железы, которые осуществлялись по стандартной методике на формалин-фиксированных парафиновых срезах с целью определения эстроген-, прогестероновых рецепторов, рецепторов к HER 2/neu, BRCA1, VEGF, Ki-67.

Принцип действия метода: при нанесении на тканевый срез моноклональной сыворотки к искомому антигену (эстроген-, прогестероновым рецепторам, рецепторам к HER 2/neu, BRCA1, VEGF, Ki67) при его наличии образуется иммунный комплекс, который при дальнейшей обработке становится видимым в световой микроскоп и доступен для интерпретации.

На депарафиновый гистологический тканевый срез на стекле наносили на 5 минут раствор перекиси водорода, отмывали, срез прогревали в буфере для демаскировки антигенов, промывали. Наносили первичные антитела к исследуемым антигенам (эстроген-, прогестероновым рецепторам, рецепторам к HER 2/neu, VEGF, Ki-67). После инкубации срезы промывали и наносили реагент для визуализации (использовались реагенты фирм «DACO» и «DBS», США).

Далее срез отмывали и обрабатывали DAB хромогеном, делающим видимыми образовавшиеся иммунные комплексы на тканевых срезах. Срезы окрашивали гематоксилином, обезживали. В световом микроскопе образцы интерпретировали при увеличении $\times 400$ – 1200 .

В материале рака молочной железы рецепторный статус (ЭР, ПР, HER-2/neu) определялся только в инвазивном компоненте первичной опухоли, не подвергшейся противоопухолевому лечению. При оценке ЭР и ПР рецепторного статуса определяли процент окрашенных ядер опухолевых клеток и интенсивность окраски.

Результат определяли от 0 до 8 баллов. Негерцептест интерпретировали по полноте и интенсивности окраски мембран раковых клеток. Результат определяли в баллах от 0 до 3. Результат экспрессии VEGF определяли по интенсивности окрашивания от 0 (отрицательный), до + (слабоположительный), ++ (умеренноположительный), +++ (сильно выраженный).

Результаты и обсуждение

Локализация РМЖ была разнообразной, наиболее часто – в верхне-наружном квадранте (27,7 %), на втором месте – в нижне-наружном квадранте (23,6 %). Реже всего встречались карциномы на границе внутренних квадрантов – 6,7 % (табл. 1). Среди пациенток с ранним РМЖ превали-

ровали варианты опухоли T_{1c} – 77,7 % (табл. 2). Опухоли T_{1a} и T_{1b} встречались относительно редко (табл. 2). Чаще первичная бластома была доступна пальпации, имела плотную консистенцию, бугристый контур, относительную подвижность, за исключением 1 случая с T_{1mic} , когда карцинома была обнаружена на фоне фиброаденомы.

Большая часть опухолей были диагностированы на этапе, когда первичный процесс стал доступен пальпации, так как основная часть больных (80,9 %) имели наибольший для T_1 размер: от 1,0 до 2,0 см – T_{1c} . У 14,1 % больных опухоли были выявлены при размере от 0,5 до 1,0 см – T_{1b} . Болезненность опухоли отмечалась только у 2,0 % больных (табл. 3).

При морфологическом исследовании было установлено, что чаще встречался инфильтративный протоковый рак (90,6 %). Инфильтративный дольковый отмечен всего в 9,4 % случаях. Частота перитуморальной инвазии сосудов в данной группе составила 12,2 %.

При изучении степени злокачественности карцином установлено, что преобладали опухоли 2 степени злокачественности (50 %). Третья степень определялась в 38,6 % опухолей, первая выявлена в 11,4 % (табл. 4).

По результатам исследования одновременно положительные ЭР и ПР были выявлены в большинстве случаев – 39 %, реже встречались сочетания ЭР+ПР – 18,2 %, отрицательные ЭР и ПР выявлены в 25,7 %, наименьшее количество опухолей имели ЭР-ПР+ – 16,9 % (табл. 5).

У 115 пациенток из 148 были определены HER2/neu рецепторы (табл. 6). Из них HER 2/neu⁺ встречались у 48,7 %, HER 2/neu⁺ и ++ – у 36,5 %, HER 2/neu⁺⁺⁺ – у 14,8 %.

Положительная реакция на рецепторы VEGF отмечалась в 43,8 % случаев (табл. 7). Показатели Ki-67 были определены у 55 (37,1 %) из 148 опухолей. Большинство опухолей имели невысокий (0–25 %) индекс пролиферативной активности – 36,3 %, а у 9,1 % – показатели были максимальными – 70–100 % (табл. 8).

Заключение

В исследованной группе у больных с РМЖ $T_1N_0M_0$ преобладали опухоли, локализовавшиеся в верхне-наружном квадранте (27,7 %) размером T_{1c} доступные пальпации (80,9 %), гистологически преобладали инфильтративно-протоковые раки (90,6 %) с незначительной перитуморальной инвазией сосудов (12,2 %), 2 степени злокачественности (50,0 %).

Несмотря на размеры первичного процесса – T_1 и отсутствие клинически определяемых метастазов, опухоль, которая считается ранним раком потенциально является агрессивной: рецепторы ЭР+ПР+ определялись лишь у 39,2 %, положительные рецепторы HER2/neu были обнаружены у 51,3 %, из них +++ составили 14,8 %.

Положительная реакция на VEGF-рецепторы зафиксирована у 43,8 %, высокий индекс пролиферативной активности (51–100) обнаружен у 30 % пациенток.

Полученные морфо-биологические результаты изучения опухоли $T_1N_0M_0$, свидетельствуют о потенциальной агрессивности опухоли примерно у половины пациенток с клинически ранним раком, что требует необходимости комплексного подхода в лечении данной категории больных.

Таблица 1

Локализация первичной опухоли

Квадрант	абс. число	%
Верхнее-наружный	41	27,7
Нижнее-наружный	35	23,6
На границе наружных	14	9,4
Верхнее-внутренний	22	14,8
Нижнее-внутренний	15	10,1
На границе внутренних	10	6,7
Центральная зона (за соском)	11	7,4
Всего	148	100,0

Таблица 2

Распределение больных по размерам опухоли

Наибольшее измерение, см	абс. число	%
T _{1mic} (<0,1)	1	0,7
T _{1a} (от 0,1 до 0,5)	5	3,4
T _{1b} (от 0,5 до 1,0)	27	18,2
T _{1c} (от 1,0 до 2,0)	115	77,7
ВСЕГО	148	100,0

Таблица 3

Данные о размерах и болевых ощущениях в опухоли

Размер опухоли в наибольшем измерении, см	Пальпируемая опухоль		Болевые ощущения	
	абс. число	%	абс. число	%
T _{1mic} (<0,1)	–	–	–	–
T _{1a} (от 0,1 до 0,5)	3	1,3	–	–
T _{1b} (от 0,5 до 1,0)	21	14,1	–	–
T _{1c} (от 1,0 до 2,0)	115	80,9	3	2

Таблица 4

Степень злокачественности опухоли

Степень злокачественности	абс. число	%
1	17	11,4
2	74	50,0
3	57	38,6
ВСЕГО	148	100,0

Таблица 5

Наличие в опухоли ЭР и ПР рецепторов

ЭРПР–рецепторы	абс. число	%
ЭР+ПР+	58	39,2
ЭР-ПР-	38	25,7
ЭР-ПР+	25	16,9
ЭР+ПР-	27	18,2
ВСЕГО	148	100,0

Таблица 6

Наличие HER2/neu–рецепторов

HER2/neu–рецепторы	абс. число	%
Отрицательные	56	48,7
+	34	29,6
++	8	6,9
+++	17	14,8
ВСЕГО	115	100,0

Таблица 7

Наличие рецепторов VEGF

VEGF–рецепторы	абс. число	%
Отрицательный	32	56,2
Положительный	25	43,8
ВСЕГО	57	100,0

Таблица 8

Индекс пролиферативной активности Ki-67

Показатели Ki-67	абс. число	%
0–25	20	36,3
26–50	18	32,7
51–75	12	21,9
76–100	5	9,1
ВСЕГО	55	100,0

Литература

1. Моисеенко В.М, Семглазов В.Ф, Тюлядин С.А. Современное лекарственное лечение местнораспространенного и метастатического рака молочной железы. – СПб: Издательство «Грифон», 1997. – С. 94.
2. Порханов В.А, Барышев А.Г, Тесленко Л.Г. и др. Анализ и пути совершенствования онкологической службы Краснодарского края (1999–2008 годы). – Краснодар, 2009. – С. 252.
3. Bendell J.C. Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma // *Cancer*. – 2003. – Vol. 97(12). – P. 2972–7.
4. Boring W.P. Cancer statistic // *CA Cancer J. Clin.* – 1994. – Vol. 199 (44). – P. 7–26.
5. Clayton A.J. Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer // *Br J Cancer*. – 2004. – Vol. 91(4). – P. 639–43.
6. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer // *The Oncologist*. – 2000. – Vol. 5(1). – P. 37–44.
7. Gennari R. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors over expressing HER2 // *Clin Cancer Res*. – 2004. – Vol. 10(17). – P. 5650–5.
8. Lin N.U., Winer E.P. Brain metastases: the HER2 paradigm // *Clin Cancer Res*. – 2007. – Vol. 13(6). – P. 1648–55.
9. Mahmoud-Ahmed A.S. Results of whole brain radio therapy in patients with brain metastases from breast cancer: a retrospective study // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. – 2002. – Vol. 54(3). – P. 810–7.
10. Maru D. HER-2/neu and p53 over expression as biomarkers of breast carcinoma in women age 30 years and younger // *Cancer*. – 2005. – Vol. 103(5). – P. 900–5.
11. Pegram M.D., Reese DM. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor // *Semin. Oncol.* – 2002. – Vol. 29(1). – P. 29–37.
12. Peto C. Molecular portraits of human breast tumors // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – P. 747–52.
13. Silva, O. E., Zurrida S. Breast Cancer. – A Practical Guide Third Edition, 2005. – 21 p.
14. Slamon D.J. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // *Science*. – 1987. – Vol. 235(4785). – P. 177–82.
15. Stemmler H.J. Characteristics of patients with brain metastases receiving trastuzumab for HER2 overexpressing metastatic breast cancer // *Breast*. – 2006. – Vol. 15(2). – P. 219–25.
16. Tham Y.L. Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases // *Cancer*. – 2006. – Vol. 107(4). – P. 696–704.
17. Yau T. Incidence, pattern and timing of brain metastases among patients with advanced breast cancer treated with trastuzumab // *Acta Oncol.* – 2006. – Vol. 45(2). – P. 196–201.

УДК 618.19-006.6-033.2:616-08-059

II. ЛЕЧЕНИЕ РАННЕГО МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

При раке молочной железы с размером первичной опухоли менее 1 см имеются метастазы в регионарные лимфоузлы, а также отдаленные метастазы. Системное лечение, включающее хирургическое, лучевое, химиотерапию, эндокринную терапию, а также таргетную терапию, улучшает результаты безрецидивной и общей выживаемости.

Ключевые слова: рак молочной железы, радиотерапия, химиотерапия, эндокринотерапия, таргетная терапия, безрецидивный период, HER2/neu, VEGF-рецепторы.

II. TREATMENT OF EARLY METASTATIC BREAST CANCER

Abstract

About 20 % of patients have metastasis in lymph nodes and distant metastasis, even when diagnosed at early stages of breast cancer. Systemic treatment including surgical, radiotherapy, chemotherapy, hormonal therapy, and target therapy, improves survival rate and disease-free survival.

Key words: breast cancer, surgical, radiotherapy, chemotherapy, hormonal therapy, target therapy, disease free survival rate, HER2/neu, VEGF receptor.

Введение

Известно, что уже при раннем РМЖ (размер опухоли менее 1 см) в 10–24 % случаях имеются метастазы в регионарные лимфоузлы, а также отдаленные метастазы. Поэтому раннее назначение системного лечения снижает частоту возможно уже имеющихся микрометастазов [4; 6]. Хирургический метод является сегодня одним из ведущих в лече-

нии РМЖ. С развитием современных методов диагностики, позволяющих точно определить стадию опухолевого процесса, а также с использованием ЛТ и ХТ, стало возможным проведение органосохраняющих операций при РМЖ I и II стадий [2; 3; 26]. Частота развития рецидивов, присущая органосохраняющему лечению, по данным Европейской организации по исследованию и изучению рака невысока – 5,2 % за 6 лет [10].

Больным стадиями IIIA и IIIC может быть выполнена радикальная мастэктомия по Маддену, при этом показатели безрецидивной выживаемости не снижены по сравнению с таковыми после мастэктомии по Пейти, Холстеду и расширенной радикальной мастэктомии [23; 27].

Применение предоперационной лучевой терапии в комбинации с химиотерапией позволяет получить частичную регрессию опухоли у 80 % больных, что создает возможность для выполнения радикальной операции и тем самым – для улучшения отдаленных результатов лечения [25]. Послеоперационная лучевая терапия по данным международных рандомизированных исследований продемонстрировала снижение риска местного рецидива и увеличение общей выживаемости [1; 16].

Применение неоадьювантной терапии позволяет увеличить безрецидивную и общую выживаемость больных. Так 8-летняя BRB у больных с полным морфологическим регрессом опухоли IV степени лечебного патоморфоза составляет 86 %, III степени – 58 %, I–II степени – 37 % ($p=0,034$) [12].

Преимущество использования адьювантной химиотерапии у пациенток с метастазами в региональных лимфоузлах подтверждено различными рандомизированными клиническими исследованиями и демонстрирует снижение риска рецидива и увеличение выживаемости. Так, например, схема CMF снижает риск рецидива на 24 % и смертность на 14 %. В конце 1970-х и в 1980-е гг. антрациклин-содержащие режимы (FEC, FAC, AC) показали большую активность (снижая риск рецидива и смерти на 12%) по сравнению с комбинацией CMF [7; 9; 14; 17]. В 1990-е гг. для адьювантной терапии были исследованы таксаны, которые показали улучшение выживаемости на 4–7 %, по сравнению с антрациклин-содержащими режимами [11; 15].

Новые рекомендации по лечению ранних форм рака молочной железы были разработаны на конференции в Сан-Галлене в 2009 г [20]. Анти-HER2/neu терапия трастузумабом считается показанной пациентам с положительным Her2/neu статусом [5; 20]. Пациентки, получающие анти-HER2-терапию, должны также получать и химиотерапию, предшествующую или сопутствующую анти-HER2-терапии [5]. Больные с минимальными первичными опухолями ($pT_{1a}N_0ER$) могут не получать системной адьювантной химиотерапии [5]. Больные с опухолями $pT_{1a}N_0M_0ER^+$ могут получать только эндокринотерапию, даже если имеются другие признаки, при которых раньше рекомендовали химиотерапию [5; 20]. Высокая степень злокачественности опухоли является веским основанием для назначения адьювантной химиотерапии [20].

Несмотря на успехи современной терапии, в настоящее время не существует стандарта лечения пациенток с HER2/neu (+++) позитивным местнораспространенным и/или метастатическим раком молочной железы с использованием трастузумаба. Не решен вопрос о необходимости использования трастузумаба у пациенток с неадьювантной целью, а также в адьювантном режиме с размером опухоли менее (или) 1 см [8; 19; 22].

В ряде исследований была установлена связь между экспрессией VEGF при раннем раке молочной железы и длительностью безрецидивного периода и ОВ. Результаты этих исследований подтвердили необходимость воздействия на ангиогенез как составляющей противоопухолевого лечения [13; 21]. Результаты проведенных клинических исследований предполагают, что при РМЖ сигналь-

ные пути HER2/neu и VEGF пересекаются на молекулярном уровне, что в конечном счете также ведет к пролиферации клеток, обуславливает агрессивность течения опухолевого процесса, который наблюдается при HER2-положительных формах заболевания [18; 24]. Учитывая данный факт, вполне оправданным является изучение возможности использования комбинация анти-HER2(трастузумаб) и анти-VEGF терапии (бевацизумаб) при лечении РМЖ с положительным статусом HER2/neu.

Материалы и методы

Проанализированы результаты лечения 2 групп пациенток РМЖ: первая группа ($T_1N_0M_0$) – 148 больных, у которых отсутствовали метастазы в регионарные лимфоузлы и отдаленные метастазы.

Вторая группа ($T_1N_{1-3}M_0$) – 117 больных с метастазами в регионарные лимфоузлы (ранний метастатический рак). Больным проведены стандартные методы обследования: маммография, рентгенография, УЗИ, компьютерная томография, сцинтиграфия костей скелета проводились по стандартным общепринятым методикам.

В зависимости от стадии заболевания у больных применялись различные схемы лечения. Проведенное лечение соответствовало общепринятым стандартам с использованием всех его видов: хирургического, лучевого и лекарственного. План лечения составлялся с учетом локализации опухоли, возраста пациентки, сопутствующих заболеваний, общего состояния больной.

33 (44,8 %) больным $T_1N_0M_0$ и 7 (5,9 %) пациенткам $T_1N_{1-3}M_0$ проведены органосохраняющие операции. 115 (77,7 %) больным ($T_1N_0M_0$) проведены радикальные мастэктомии: по Маддену 86 (58,1 %) и по Пейти – 29 (19,6 %). 99 (84,6 %) женщинам с РМЖ $T_1N_{1-3}M_0$ проведены радикальные операции: по Маддену у 83 (70,9 %) больных и по Пейти – у 16 (13,7 %) больных.

32 (21,6 %) больным 1 группы и 7 (5,9 %) пациенткам 2 группы лучевую терапию проводили после органосохраняющей операции на оставшуюся часть молочной железы в дозе 50 Гр и на зону регионарных лимфатических узлов в дозе 40 Гр, а также 10–15 Гр на послеоперационный рубец. У 82 (71,9 %) больных 1 группы и у 99 (84,6 %) больных 2 группы лучевую терапию проводили на послеоперационный рубец и на зону регионарных лимфатических узлов в дозе 40 Гр.

Предоперационная лучевая терапия проводилась пациенткам со стадией $T_1N_3M_0$. Облучение молочной железы с опухолью и регионарных лимфатических узлов у 16 (10,5 %) пациенток 2 группы проводилось в дозе 40–44 Гр. Радикальная лучевая терапия осуществлялась у 11 (9,4 %) пациенток 2 группы со стадией $T_1N_3M_0$, которых не оперировали.

Неоадьювантная химиотерапия проведена до оперативного вмешательства 30 (25,6 %) пациенткам 2 группы. Использовали схему FAC. Как правило, проводили 3–4 цикла, затем выполнялась операция. В послеоперационном периоде пациентки получали 6 циклов по схемам FAC или TAD, выбранной на основе определения степени лекарственного патоморфоза.

Адьювантная химиотерапия проводилась при наличии хотя бы одного из признаков: отсутствии в ткани опухоли рецепторов эстрогена и (или) прогестерона, возрасте больных до 40 лет, размере опухоли более 1,5 см, а также при низкодифференцированных опухолях.

Химиотерапию проводили с использованием схемы FAC. Обычно ХТ осуществлялась на 20–28 сутки после операции. У 91 (61,5 %) пациенток 1 группы и 88 (75,2 %) 2 группы проведено по 6 курсов FAC. У 9 (6,1 %) 1 группы и 18 (15,4 %) пациенток с HER2/neu +++ использовали схему TAD + герцептин. TAD (таксотер 75 мг/м² + доксорубин 50 мг/м²), 1 день, каждый 21 день, 6 курсов. По окончании химиотерапии пациентки получали герцептин по 6 мг/кг (первое введение 8 мг/кг) 1 раз в 3 недели или 2 мг/кг (первое введение 4 мг/кг) еженедельно в течение 1 года.

Пациентки обеих групп с положительными ЭР после окончания ХТ принимали тамоксифен 20 мг ежедневно в течение 5 лет при отсутствии прогрессирования процесса. В 1 группе 85 (57,4 %) больных получали тамоксифен после окончания всех видов лечения, во второй группе – 54 (46,2 %).

В основу исследования положено определение длительности безрецидивного периода (время от начала лечения до появления метастазов) у пациенток обеих групп с учетом биологических особенностей опухоли (экспрессия HER2/neu, VEGF, Ki-67).

Результаты

Метастазы после лечения больных ранним метастатическим РМЖ при T₁N₁₋₃M₀ возникали чаще на 69,8 % (p<0,001), чем при T₁N₀M₀, при этом отдаленные метастазы в лимфоузлы отмечались чаще на 25,6 % (p<0,05), в легкие – на 9,6 % (p<0,05), в печень – на 2,2 % (p<0,05).

У больных РМЖ с T₁N₀M₀ по сравнению с пациентками с T₁N₁₋₃M₀ уже через 1 год после лечения выявляется превышение частоты безрецидивного течения на 18,5 % (p<0,001) с возрастанием этой разницы до 85,1 % (p<0,05) к 4,5 годам после лечения и ее уменьшением до 15,8 % (p<0,05) к 8 годам. Медиана безрецидивного периода в группе T₁N₀M₀ составляет 11 лет, а в группе T₁N₁₋₃M₀₋₁ – 4 года.

К 8,5 годам после комбинированного лечения РМЖ T₁N₀M₀ частота безрецидивного периода выше на 21,1 % (p<0,05), чем после комплексного. Медиана безрецидивного периода после проведенного комплексного лечения составила 11 лет, после комбинированного – 8,5 лет.

У больных РМЖ T₁N₀M₀ продолжительность безрецидивного течения после лечения при отсутствии рецепторов HER2/neu составляла 12 лет, при наличии HER2/neu + и ++ – 6,5 года, с HER2/neu +++ – не достигнута, так как у всех больных, получавших лечение по схеме TAD+герцептин, не выявлено прогрессирования процесса. При HER2/neu + и ++ к 3,5 годам после лечения частота безрецидивного периода была ниже на 27,7 % (p<0,05) по сравнению с данными при HER2/neu⁻. У больных раком молочной железы с T₁N₀M₀ в группе HER2/neu⁻ после лечения с применением ХТ по схеме FAC медиана равна 12 лет, при наличии рецепторов HER2/neu 1+ и 2+ – 6,5 лет и при HER2/neu 3+ – 1,5 года.

Применение ХТ по схеме TAD с герцептином при наличии рецепторов HER2/neu 3+ по сравнению с применением схемы FAC увеличивает частоту безрецидивного течения процесса к 2 году после лечения на 66,7 % (p<0,01). Медиана в группе TAD не достигнута, так как у больных в течение 2 лет не было метастазов. При наличии у больных РМЖ T₁N₀M₀ с HER2/neu-положительных рецепторов VEGF+ к 4 году после лечения частота безрецидивного течения процесса уменьшилась на 28,6 %

(p<0,05). Медиана безрецидивного периода в группе VEGF+ составила 11 лет.

Если рецепторы VEGF+ были у больных с наличием HER2/neu + и ++, то к 3,5–4,5 годам после лечения частота безрецидивного течения процесса уменьшилась на 52,7 % (p<0,05). Медиана безрецидивного периода в группе VEGF+ составила 5,5 лет. У больных РМЖ T₁N₀M₀ с HER2/neu +++ период безрецидивного течения не зависел от наличия рецепторов VEGF. Медиана в группе VEGF+ составила 2 года. При наличии рецепторов HER2/neu +++ период безрецидивного течения процесса не зависел от наличия рецепторов VEGF.

У больных РМЖ T₁N₁₋₃M₀ после лечения при отсутствии рецепторов HER2/neu рецидивы и метастазы не наблюдались в течение 3,5 лет, при наличии HER2/neu 1+ 2+ – в течение 1 года, а при наличии HER2/neu 3+ рецидивы и метастазы уже через 0,5 года отмечены у 12,1 % больных. При применении схемы ХТ FAC при наличии рецепторов HER2/neu 3+ через полгода после лечения рецидивы и метастазы уже через 0,5 года были у 26,7 % больных. Медиана безрецидивного периода в группе HER2/neu⁻ составила 7 лет, HER2/neu +, ++ – 4 года, HER2/neu +++ – 1,5 года.

У больных РМЖ T₁N₁₋₃M₀ с рецепторами HER2/neu 3+ после лечения с применением схемы химиотерапии FAC выявлялись уже в первые полгода. Частота безрецидивного течения при применении ХТ по схеме TAD с герцептином была выше, чем при применении схемы FAC через 0,5 года на 26,7 %, через 1 год – на 86,7 %, через 1,5 года – на 60,0 %, через 2 года – на 43,3 %. Медиана безрецидивного периода в группе FAC составила 1 год, в группе TAD+герцептин – 2 года.

Наличие рецепторов VEGF у больных раком молочной железы T₁N₁₋₃M₀ уменьшало продолжительность безрецидивного течения после лечения при HER2/neu⁻ к 4,5 годам на 42,9 %; при HER2/neu + и ++ – к 1,5 годам – на 23,3 %, к 2,5 годам – на 91,1 %, к 3 годам – на 22,2 %; при HER2/neu +++ к 1 году после лечения – на 44,9 %, к 1,5 годам – на 40,0 %. Медиана безрецидивного периода в группе HER2/neu⁻ с наличием рецепторов VEGF составила 4,0 года, с отсутствием рецепторов VEGF – 4,5 года. В группе HER2/neu +, ++ с наличием рецепторов VEGF составила 2 года, с отсутствием рецепторов VEGF – 5,5 лет. В группе HER2/neu 3+ после лечения с наличием рецепторов VEGF составила 1,5 года, с отсутствием рецепторов VEGF – 2 года.

Выводы

1. Для повышения эффективности лечения раннего метастатического РМЖ необходимо учитывать медико-биологические особенности опухолевого процесса, позволяющие своевременно обосновывать целесообразность таргетной терапии в комплексном лечении.
2. У больных раком молочной железы T₁N₀M₀ и T₁N₁₋₃M₀ прогноз неблагоприятен при регистрации высокого уровня экспрессии генов HER2/neu и VEGF.
3. В алгоритм комплексного лечения раннего метастатического рака молочной железы (T₁N₁₋₃M₀) при обнаружении экспрессии HER2/neu 1+, 2+, 3+ и VEGF целесообразно включать в неoadъювантном и адъювантном режиме ПХТ (TAD, FAC) в сочетании с герцептином, авастинном.

Литература

1. Кондратьева А.П. Комбинация лучевой терапии с лекарственными препаратами в лечении некоторых злокачественных опухолей / Под ред. И.В. Поддубной. – М., 2003. – С. 4–5.
2. Летагин В.П. Первичные опухоли молочной железы: практическое руководство. – М., 2004. – С. 77–9.
3. Портной С.М., Лактионов К.П., Барканов А.И. Эффективность органосохраняющих операций при раке молочной железы T₁₋₂N₀M₀ // Вопр. онкологии. – 1998. – Т. 44, № 4. – С. 439–42.
4. Семиглазов В.Ф. Хирургическое лечение рака молочной железы (история и современность). – Практическая онкология : избранные лекции / Под ред. С.А. Тюляндина, В.Ф. Моисеенко. – СПб.: Центр ТОММ, 2004. – С. 63–72.
5. Семиглазов В.Ф. Обзор основных положений консенсуса по адъювантной терапии первичного операбельного рака молочной железы в Сан-Галлене, 2009г. // Материалы XIII Российского онкологического конгресса, Москва, 17–19 ноября 2009 г. – М., 2009. – С. 155–65.
6. Тюляндин С.А. Системная терапия операбельного рака молочной железы. – Практическая онкология: избранные лекции / Под ред. С.А. Тюляндина, В.Ф. Моисеенко. – СПб.: Центр ТОММ, 2004. – С. 63–72.
7. Тюляндин С.А. Выбор режима адъювантной химиотерапии у больных раком молочной железы с метастазами в подмышечных лимфоузлах // Материалы XIII Российского онкологического конгресса, Москва, 17–19 ноября 2009 г. – М., 2009. – С. 166–71.
8. Beslija S., Bonnetterre J., Burstein H. et al. Second consensus on medical treatment of metastatic breast cancer // Ann Oncol. – 2007. – 18(2). – P. 215–25.
9. Biganzoly L., Goldrisc A., Straehle C. et al. Adjuvant chemotherapy in elderly patients with breast cancer: a survey of the Breast International Group (BIG) // Ann Oncol. – 2004. – 15. – P. 207–10.
10. Bijker N., Rutgers E.J., Duchateau L. et al. Breast-conserving therapy for Paget disease of the nipple: a prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Study of 61 Patients // Cancer. – 2001. – Vol. 91. – P. 472–7.
11. Bianco A.R., de Matteis A., Manzione L. et al. Sequential epirubicin-docetaxel-CMF as adjuvant therapy of early breast cancer: results of the Taxit216 multicenter phase III trial // J. Clin. Oncol. – 2006. – 24(18). – S. 8.
12. Bonadonna G., Valagussa P., Brambilla C. et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer eight-year experience at the Milan Cancer Institute // J. Clin. Oncol. – 1998. – 16(1). – P. 93–100.
13. Bossung V., Harbeck N. Angiogenesis inhibitors in the management of breast cancer // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 2010. – 22(1). – P. 79–86.
14. Colozza M., De Azambuja E., Cordero F. et al. Breast cancer: achievements in adjuvant systemic therapies in the pre genomic era // Oncologist. – 2006. – 11. – P. 111–25.
15. Crown J.P., Francis P., Di Leo A. et al. Docetaxel given either concurrently or sequentially to anthracycline-based adjuvant therapy for patients with node-positive breast cancer: comparison with non-taxane combination therapy. First results of the BIG 2-98 trial at 5 years median follow-up // J Clin Oncol. – 2006. – 24(18). – S. 7.
16. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects on radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials // N Engl J Med. – 1995. – 333(22). – P. 1444–55.
17. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of Chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-years survival: an overview of the randomized trials // Lancet. – 2005. – 365. – P. 1687–717.
18. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer // The Oncologist. – 2000. – 5. – P. 37–44.
19. Gennari R., Menard S., Fagnoni F. et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2 // Clin Cancer Res. – 2004. – 10(17). – P. 5650–5.
20. Goldhirsch A.J., Ingle J.N., Gelber R.D. et al. Threshold for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009 // Annals of Oncology. – 2009. – 20(8). – P. 1319–29.
21. Hayes D.F., Miller K., Sledge G. Antiogenesis as target breast cancer therapy // The Breast. – 2007. – 16. – S. 17–19.
22. HERceptin full prescribing information / Accessed. – 2007 – May 4.
23. Lacour J., Le M., Caceres E. et al. Radical mastectomy versus radical mastectomy plus internal mammary dissection: ten yer resalts of an international cooperative trial in breast cancer//Cancer. – 1983. – 51. – P. 1941–3.
24. Pegram M.D., Reese D.M. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor // Semin Oncol. – 2002. – 29(III). – P. 29–37.
25. Stephens F.O. Induction chemotherapy: to downgrade aggressive cancers to improve curability by surgery and/or radiotherapy // European Journal of Surgical Oncology. – 2009. – 27(7). – P. 672–88.
26. Veronesi U., Cascinelly N., Mariani L. et al. Twenty-year follow-up of randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer // N Engl J Med. – 2002. – 347(16). – P. 1227–32.
27. Veronesi U., Valagussa P. Inefficacy of internal mammary nodes dissection in brest cancer surgery // Cancer. – 1981. – 47. – P. 170–5.

УДК 618.19-006.6-033.2:615.277.3.015.44

III. ХИМИОТЕРАПИЯ РАННЕГО МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

Лекарственная терапия раннего метастатического рака молочной железы остается актуальной в настоящее время. Выбор комбинации препаратов должен быть сделан с учетом биологических особенностей (VEGF и HER 2/neu рецепторный статус), эффективности, толерантности, влияния на качество жизни пациентов. Добавление таргетной терапии (авастина и герцептина) улучшает результаты безрецидивной выживаемости.

Ключевые слова: ранний метастатический рак молочной железы, химиотерапия, таргетная терапия, безрецидивная выживаемость, HER 2/neu, VEGF рецепторы.

III. CHEMOTHERAPY OF EARLY METASTATIC BREAST CANCER

Abstract

At present early metastatic breast cancer therapy is still relevant. Drugs combination should be done in accordance to tumor's biological features (VEGF and HER 2/neu receptor status), efficiency, tolerance, influence on patient's quality of life. The additional target therapy including avastin or herceptin improves recurrence-free survival.

Key words: early metastatic breast cancer, chemotherapy, targets therapy, survival rate, HER2/neu, VEGF receptor.

Введение

Химиотерапия играет большую роль в лечении раннего метастатического рака молочной железы РМЖ. Наиболее перспективным считается использование комбинированной химиотерапии с включением лекарственных комбинаций различных препаратов (навельбин, таксол, таксотер, гемзар), эффективность которых в терапии первой линии метастатического РМЖ выше режимов с антрациклинами (АС, FAC, FEC; 1; 2; 3; 4; 8).

Из всех используемых химиопрепаратов наиболее эффективными являются таксаны: таксол (паклитаксел) и таксотер (доцетаксел); эффективность в монорежиме от 29–42 %, в комбинации с другими цитостатиками (доксорубицином, навельбином, карбоплатином, цисплатином) составила 62–82 % [6; 7; 9; 10; 14].

У пациенток с гиперэкспрессией HER-2/neu необходимо сочетать химиотерапию с герцептином [5; 16]. Проведено несколько исследований, в которых оценивалась эффективность комбинации доцетаксела – 75 мг/м² и цисплатина – 75 мг/м² (или карбоплатина AUC 6) в комбинации с герцептином в еженедельном режиме. Общая эффективность цисплатинсодержащего режима составила 79 %, медиана времени до прогрессирования – 12,7 мес. При использовании карбоплатин-содержащего режима общая эффективность составила 56 %, медиана времени до прогрессирования – 17 мес.

Результаты рандомизированного исследования III фазы показали высокую эффективность комбинации герцептин + паклитаксел + карбоплатин в 1-й линии лечения метастатического РМЖ [15]. Пациентки (196 человек) были рандомизированы в две группы: 1: паклитаксел – 175 мг/м² (6 циклов) + герцептин в еженедельном режиме; 2: паклитаксел 175 мг/м², карбоплатин AUC 6 + герцептин в еженедельном режиме. Добавление карбоплатина к комбинации герцептин + паклитаксел увеличивало как непосредственную эффективность лечения (57 против 37 % в подгруппе больных с опухолью HER-2-neu+), так и медиану времени до прогрессирования (14 мес. против 7,1 мес. в подгруппе больных с опухолью HER-2-neu+). Медиана общей выживаемости в группе с герцептином – 42 мес. (без герцептина – 26 мес.).

Высокая эффективность комбинации пегилированного липосомального доксорубина (келикс) и герцептина в 1-й линии лечения больных метастатическим РМЖ с гиперэкспрессией HER-2 (FISH+) была показана в одном из исследований [11]. В нем приняли участие 19 пациенток, получавших герцептин в 3-недельном режиме (8 мг/кг – нагрузочная доза, далее 6 мг/кг каждые 3 недели) + келикс – 35 мг/м² (инфузия не менее часа) + паклитаксел – 175 мг/м². Объективный эффект был зарегистрирован в 71 % случаев (полная ремиссия – 41 %, частичная ремиссия – 30 %), в 29 % случаев отмечена стабилизация заболевания длительностью более 6 мес.

Добавление авастина в 1-й линии терапии метастатического РМЖ значительно улучшает общую эффективность лечения и увеличивает время до прогрессирования, а также увеличивает общую выживаемость пациентов. Так, например, в исследовании III фазы E2100 [12] изучался авастин в комбинации с паклитакселом в качестве 1-й линии терапии метастатического рака молочной железы. Включенные в исследование 715 больных (HER/2neu негативный статус) были рандомизированы в 2 группы: паклитаксел – 90 мг/м² еженедельно в течение 3 недель с последующим недельным перерывом (n=350) или паклитаксел – 90 мг/м² еженедельно в течение 3 недель + авастин – 10 мг/кг каждые 2 недели (n=365). Результаты исследования показали, что добавление авастина позволило статистически значимо увеличить непосредственную эффективность лечения: общий эффект составил 36,9 % против 21,2 % – при монотерапии паклитакселом. Отдаленные результаты лечения также оказались выше в группе с авистином: медиана выживаемости без прогрессирования составила 11,8 мес., а медиана выживаемости в группе паклитаксела – 5,9 мес. Таким образом, результаты, полученные в исследовании E2100, делают оправданным назначение комбинации бевацизумаб + паклитаксел в качестве первой линии лечения у больных с метастатическим раком молочной железы, не экспрессирующим HER-2/neu.

Хорошие результаты были получены в рандомизированном, двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании III фазы AVADO (BO17708), в котором был использован в качестве 1 линии терапии доцетаксел в комбинации с авистином или плацебо.

В исследование включено 736 пациенток с HER2/неу негативным метастатическим раком молочной железы. Пациентки получали авастин в дозе 15 мг/кг или 7,5 мг/кг. Общий ответ в группе авастина – 15 мг/кг + доцетаксел составил 63 %, в группе авастина – 7,5 мг/кг + доцетаксел – 55 %, в группе без авастина – 44 %. Однолетняя безрецидивная выживаемость в группе авастина (15 мг/кг) составила 83 %, в группе авастина (7,5 мг/кг) – 78 %, в группе без авастина – 73 % [13].

Таким образом, для достижения максимального клинического эффекта современная лекарственная терапия должна включать высокоэффективные комбинации химиотерапевтических препаратов в сочетании с таргетной терапией авестином и при Her 2 /neu 3+ опухолях – герцептином.

Материалы и методы

Химиотерапия 1 линии раннего метастатического РМЖ (размер первичной опухоли T₁) проведена 142 больным. У 35 пациенток изначально выявлена IV стадия (T₁N₁₋₃M₁), у 107 пациенток были различные стадии (37 больных – T₁N₀M₀ и 70 – T₁N₁₋₃M₀), метастазы возникли после проведенного ранее лечения. Химиотерапия проводилась по схемам: таксотер и доксорубин (TAD – группа А, 37 больных), навельбин и доксорубин (Nav/Dox – группа Б, 30 больных), циклофосфан, доксорубин, 5-фторурацил (FAC – 40 пациентов), паклитаксел и доксорубин (РА – группа В, 35 больных) – 6 курсов. Кроме того, 10 пациенток группы TAD с HER 2 /neu 3+ и VEGF+ параллельно получали авастин в дозе 10 мг/кг 1 раз в 3 недели. После окончания курсов химиотерапии пациентки получали авастин в прежней дозе и герцептин 6 мг/кг 1 раз в 3 недели (первое введение 8 мг/кг) до прогрессирования процесса. Отбор пациенток при формировании групп осуществлялся согласно стандартным клиническим критериям.

В момент начала лечения состояние пациенток соответствовало критериям оценки ECOG 0–2 степени. Возраст пациенток больше 18 лет. Во всех случаях диагноз был подтвержден морфологически. В исследование не включали пациенток с серьезными сопутствующими или декомпенсированными соматическими заболеваниями.

Из 40 больных раком молочной железы (группа К), получавших химиотерапию по схеме FAC, у 7 (17,5 %) были метастазы в кожу, у 20 (50,0 %) – в периферические лимфоузлы, у 20 (50,0 %) – в легкие, у 25 (62,5 %) – в печень, у 2 (5,0 %) – в мягкие ткани, у 14 (35,0 %) – в кости, головной мозг 1 (2,5 %). Из 37 больных раком молочной железы (группа А), получавших химиотерапию по схеме TAD, в 7 (18,9 %) случаях выявлены метастазы в кожу, в 17 (45,9 %) – в периферические лимфоузлы, в 16 (43,2 %) – в легкие, в 22 (59,4 %) – в печень, в 2 (5,4 %) – в мягкие ткани, в 10 (27 %) – в кости, головной мозг 1 (2,7 %). Среди 30 больных раком молочной железы (группа Б), получавших химиотерапию по схеме Nav/Dox, в 5 (16,6 %) случаях были метастазы в кожу, в 14 (46,6 %) – в периферические лимфоузлы, в 15 (50,0 %) – в легкие, в 15 (50,0 %) – в печень, в 3 (10,0 %) – в мягкие ткани, в 7 (23,3 %) – в кости. Среди 35 больных (группа В), получавших химиотерапию по схеме РА, в 7 (20,0 %) случаях были метастазы в кожу, в 11 (31,4 %) – в периферические узлы, в 17 (48,5 %) – в легкие, в 15 (42,8 %) – в печень, в 2 (5,7 %) – в мягкие ткани, в 8 (22,8 %) – в кости и 1 (2,8 %) – в головном мозге.

Статистически значимых различий в частоте метастазов в отдельные органы между группами в зависимости от примененных схем ХТ не выявлено.

Результаты

Анализ эффективности терапии показал, что частота общего и полного эффектов в первой группе (TAD) была больше по сравнению с группой FAC (табл.). При сравнении клинического эффекта в группах Nav/Dox и FAC не отмечалось статистически значимой разницы. При сравнении показателей эффективности в группах Nav/Dox и TAD, также статистически значимых различий не отмечено. При сравнении клинического эффекта в группах РА (В) и FAC (К) отмечались статистически значимые различия – частота общего и полного эффектов в группе В была больше. Различия показателей эффективности химиотерапии между группой РА и группами TAD и Nav/Dox были статистически незначимы. Среди пациенток группы TAD, получавших параллельно авастин, у 2 достигнут полный эффект, у 5 пациенток выявлена частичная ремиссия, а у 3 больных – стабилизация опухолевого процесса.

Сравнение эффективности схем химиотерапии в отношении различных метастазов выявило следующие различия. В группе FAC минимальный эффект был зарегистрирован при метастазах в кожу и составил 28,5 %, (ПР – 0 %). Чувствительными к терапии оказались метастазы в периферические лимфоузлы, в печень, в легкие. Наименьшую чувствительность к лечению имели метастазы в кости и мягкие ткани. Наибольший эффект терапии отмечен на опухоль в молочной железе – 78,5 % (ПР – 28,5 %).

В группе TAD (А) наибольший эффект достигнут при метастазах в лимфоузлы – 70,5 % (ПР – 41,1 %). Высокий эффект отмечен в первичной опухоли молочной железы – 71,4 % (ПР – 42,8 %), метастазах в легкие – 75 % (ПР – 43,7 %), печень – 50,0 % (ПР – 36,3 %), кожу – 57,1 % (ПР – 28,6 %). Малочувствительными к терапии оказались метастазы в кости и мягкие ткани.

В группе Nav/Dox наибольший эффект терапии достигнут при метастазах в лимфоузлы – 71,4 % (ПР – 54,5 %). Высокий эффект отмечен в опухоли молочной железы – 60,0 % (ПР – 40,0 %), метастазах в легкие – 46,6 % (ПР – 20,0 %), печень – 53,3 % (ПР – 33,3 %), кожу – 60,0 % (ПР – 20,0 %). Малочувствительными к терапии оказались метастазы в кости – 14,2 % (ПР – 0 %). При сравнении клинического эффекта в группах Nav/Dox и FAC отмечались статистически значимые превышения частоты общего и полного эффектов при метастазах в кожу и в мягкие ткани. В группе Nav/Dox эффект на метастазы в мягкие ткани был больше, чем в группе TAD.

В группе РА наибольший эффект терапии достигнут в опухоли молочной железы – 77,7 % (ПР – 57,1 %). Высокий эффект наблюдался при метастазах в легкие, печень, кожу, лимфоузлы, мягкие ткани. Невысокую чувствительность к терапии имели метастазы в кости – 12,5 % (ПР – 0 %). При сравнении клинического эффекта в группах РА и FAC, а также TAD отмечались статистически значимые различия в частоте общего эффекта при метастазах в мягкие ткани. Он был выше в группе РА.

Разницы в эффективности групп РА и Nav/Dox не отмечено. Анализ токсичности исследуемых комбинаций противоопухолевых препаратов показал, что побочные реакции были в основном умеренной степени.

Наибольшее токсическое действие всех комбинаций было оказано на кроветворение. Лейкопения, как и анемия встречались чаще всего в группе TAD (40,7 %), в то же время лейкопения III-IV степени чаще наблюдалась в группе FAC. Нейтропения в 92,9 % случаев наблюдалась чаще в группе FAC, а III-IV степени – в группе TAD (34,9 %). Редукция дозы на 25,0 % в каждом последующем цикле в случаях фебрильной нейтропении IV степени была проведена у 2 (8,0 %) пациенток в 11(5,6%) циклах.

На втором месте было токсическое действие на желудочно-кишечный тракт: тошнота встречалась чаще в группе FAC в 87,6 % случаев (в том числе III степени – 1,7 %), рвота также в большинстве случаев проявлялась в этой группе (49,3 %, в том числе III степени – 3,1 %). Стоматит чаще встречался в группе Nav/Dox (в 16,0 % случаев, в том числе III степени – 1,2 %). Диарея чаще встречалась в группе TAD (в 20,6 % случаев), а III степени чаще наблюдалась в группе FAC (1,7 %).

На третьем месте было токсическое влияние на кожу и ее придатки. Алоpecia встречалась в 100% случаев во всех группах (в том числе III степени – 2,8 %). Изменения ногтей, сыпь и зуд кожи наиболее часто встречались в группе TAD.

Кардиотоксические проявления во всех исследуемых группах были слабой или умеренно выраженной степени и не требовали коррекции дозы.

У пациенток каждой из групп были отмечены ряд токсических реакций, характерных для таксотера: реакция гиперчувствительности – в 5,7 % случаев (I-II степени) и синдром задержки жидкости – в 10,8 % случаев (в том числе III степени – 0,5 %) наблюдались в группе TAD.

Остальные поражения различных органов и систем организма токсического генеза носили стандартный характер и имели слабую степень выраженности.

Проанализировав токсические проявления данных схем, можно отметить относительно хорошую переносимость. Длительность ремиссии определялась в случаях, когда у пациенток была достигнута полная или частичная ремиссия.

Длительность ремиссии в группе TAD. Медиана длительности ремиссии в группе TAD у всех 24 больных равна 15,5 месяцам.

Длительность ремиссии в группе FAC. Медиана длительности ремиссии у всех 13 больных составила 12 месяцев.

Длительность ремиссии в группе Nav/Dox. Медиана длительности ремиссии у всех 18 больных составила 14 месяцев.

Длительность ремиссии в группе PA. Медиана длительности ремиссии у всех 22 больных составила 14 месяцев.

Заключение

При сравнении всех режимов химиотерапии установлено, что наиболее эффективна схема TAD (ОЭ – 64,8 %, ПР – 29,7 %). Добавление к ней авастина привело к увеличению эффективности воздействия на метастазы в легкие, печень, лимфоузлы, опухоль в молочной железе. Схемы Nav/Dox и PA также оказались достаточно эффективны при различной локализации метастазов. Схема FAC была менее всего эффективна среди исследуемых комбинаций (ОЭ – 37,5 %, ПЭ – 10 %). При сравнении токсичности и длительности ремиссии между исследуемыми схемами ХТ статистических различий не было выявлено. Учитывая высокую эффективность, безопасность исследуемых комбинаций, можно рекомендовать их применение в терапии первой линии раннего метастатического РМЖ. Добавление к ХТ авастина, а также при Her 2/neu+++ герцептина улучшает результаты лечения.

Таблица

Сравнительная оценка клинического эффекта в исследуемых группах

Кл. эффект	Группы больных в зависимости от схемы химиотерапии													
	FAC (K) n=40		TAD(A) N=37			Nav/Dox (B) N=30				PA(B) n=35				
	абс. число	%	абс. число	%	P _{K-A}	абс. число	%	P _{K-B>}	P _{A-B>}	абс. число	%	P _{K-B}	P _{A-B>}	P _{B-B>}
ОЭ	15	37,5	24	64,8	<0,02	18	60	0,1	0,5	22	62,8	<0,02	0,5	0,5
ПР	4	10	11	29,7	<0,02	7	23,3	0,1	0,5	10	28,5	<0,02	0,5	0,5
ЧР	11	27,5	13	35,1	>0,5	11	36,6	0,5	0,5	12	34,2	>0,5	0,5	0,5
СП	15	37,5	7	18,9	<0,02	7	23,3	0,5	0,25	6	17,2	<0,05	0,5	0,5
ПП	10	25	6	16,2	>0,25	5	16,6	0,25	0,5	7	20	>0,5	0,5	0,5

ОЭ – общий эффект; ПР – полная ремиссия; ЧР – частичная ремиссия;

СП – стабилизация процесса; ПП – прогрессирование процесса

Литература

1. Моисеенко В.М., Семглазов В.Ф., Тюляндин С.А. Современное лекарственное лечение местнораспространенного и метастатического рака молочной железы. – СПб.: «Грифон», 1997. – С. 94–124.
2. Blajman C., Balbani L., Block J. et al. Navelbine plus Adriamycin vs FAC in advanced breast cancer // ASCO. – 1993. – 12(92). – P. 170.
3. Chevallier B., Fumoleau P., Kerbrat P. et al. Docetaxel is major cytotoxic drug for the treatment of advanced breast cancer: a Phase II of the Clinical Screening Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer // J. Clin. Oncol. – 1995. – 13. – P. 314–22.
4. Dieras V. Review of Docetaxel/Doxorubicin Combination in Metastatic Breast Cancer // Supp Oncology. – 1997. – 8. – P. 29–31.
5. Forbes J.F., Pienkowski T., Valero V. et al. Randomized phase III trial of trastuzumab plus docetaxel with or without carboplatin first line in HER2 positive metastatic breast cancer//ASCO. – 2006. – 24. – N.18S. – LBA 516.
6. Fumoleau P. A multicentre phase II study of the efficacy and safety of docetaxel as first-line treatment of advanced breast cancer: Report of the Clinical Screening Group of the EORTC // Annals of Oncology. – 1996. – 7. – P. 165–71.

7. Gianni L., Munzone E., Capri G. et al. Paclitaxel by 3-hour infusion in combination with bolus doxorubicin in women with untreated metastatic breast cancer: Hith antitumor efficacy and cardiac effects in dose-finding and sequence-finding study // J Clin Oncol. – 1995. – 13. – P. 2688–99.
8. Henderson I.C. Chemotherapy for metastatic disease. In: Harris J.R., Hellman S., Henderson I.C. Eds: Breast Diseases. 2nd, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1991. – P. 604–659.
9. Hudis C., Seidman A.D., Crown J.P.A. et al. Phase II and pharmacologic study of docetaxel as initial chemotherapy for metastatic breast cancer // J. Clin. Oncol. – 1996. – 14. – P. 58–65.
10. Holmes F.A. Update: the M. D. Anderson Cancer Center experience with paclitaxel in the management of breast cancer // Semin Oncol. – 1995. – 22. – P. 9–15.
11. Karabelis A., Kosmas C. Paclitaxel (P), pegylated liposomal doxorubicin (PLD) and trastuzumab as 1st-line chemotherapy (chemo) in HER2/neu-positive (+) metastatic breast cancer (MBC) // ASCO. – 2006. – Abstr. 10663.
12. Miller K.D., Wang M., Gralow J. et al. E2100: a randomised phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel plus bevacizumab as first-line therapy for locally recurrent or metastatic breast cancer // N. Engl. J Med. – 2007. – 357(26). – P. 2666–76.
13. Miles D., Chan A., Romieu G. et al. Randomized, double-blind placebo-controlled, Phase III study of bevacizumab with docetaxel or docetaxel with placebo as first line therapy for patients with locally recurrent or metastatic breast cancer(mBC) AVADO // J Clin. Oncol. – 2008. – 26. – 15S.
14. Ravdin P.M., Burris H.A., Cook G. et al. Phase II trial of docetaxel in patients with anthracycline – resistant or anthracycline – resistant breast cancer // J Clin Oncol. – 1995. – 13. – P. 2879–85.
15. Robert N., Leyland-Jones B., Asmar L. et al. Phase III comparative study of trastuzumab and paclitaxel with and without carboplatin in patients with HER-2/neu positive advanced breast cancer // Breast Cancer Res Treat. – 2002. – 76(suppl 1). – S37.
16. Slamon D.J. Update on Taxotere/Platinum/Herceptin combinations. – 24th Breast Cancer Symposium, San Antonio TX, USA, 2001.

УДК 618.19-006.6-033.2:615.277.3

IV. ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОРМОНА У ПАЦИЕНТОК С РАННИМ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧАВШИХ ХИМИОТЕРАПИЮ ПО СХЕМЕ FAC

Резюме

Практически у трети больных с впервые установленным ранним метастатическим раком молочной железы встречается анемия разной степени выраженности. Анемия может служить причиной уменьшения дозы, поддержки или отмены курса химиотерапии. Лечение анемии рекомбинантным человеческим эритропоэтином является необходимым элементом терапии раннего метастатического рака молочной железы.

Ключевые слова: анемия, ранний метастатический рак молочной железы, эритропоэтин.

IV. RECORMON USAGE IN TREATMENT OF PATIENTS WITH EARLY METASTATIC BREAST CANCER TREATED WITH FAC

Abstract

About one thirds of patients with primary metastatic breast cancer develops different anemia grades. Anemia may cause dose reduction of chemotherapy, delay or even withdrawal from treatment. Our observations indicate that anemia treatment with recombinant human erythropoietin should be essential element of metastatic breast cancer treatment.

Key words: anemia, metastatic breast cancer, erythropoietin.

Введение

Анемия является частым симптомом злокачественных образований. В момент постановки диагноза уже 35 % пациентов с раком молочной железы имеют анемию различной степени тяжести [1; 2]. Одним из симптомов анемии является гипоксия. Гипоксия активирует ангиогенез, пролиферацию опухолевых клеток, что способствует прогрессированию опухолевого процесса. Доказана связь между гипоксией, стадией опухолевого процесса, размерами опухоли и показателем 5-летней выживаемости [6]. Анемия развивается у пациентов как в результате онкологического процесса, так и под воздействием химио- и ЛТ [7]. В настоящее время для лечения анемии применяется рекормон (рекомбинантный человеческий эритропоэтин), который

существенно повышает уровень гемоглобина, снижает потребность в гемотрансфузиях, улучшает качество жизни пациентов [3; 4; 5].

Материалы и методы

Для коррекции анемии у 17 больных (основная группа) ранним метастатическим РМЖ, вызванной ХТ по схеме FAC, использовался препарат рекормон – рекомбинантный человеческий эритропоэтин (патент на изобретение №2314122).

В основной группе состояние по шкале ECOG 1 степени было у 29,5 % больных и 2 степени – 70,5 %. Ранее получали лечение по поводу рака молочной железы 76,5 % больных. Из них 41,3 % была выполнена операция и проведена химиолучевая терапия, 35,2 % – операция и лучевая терапия.

Локализация раннего метастатического процесса была разнообразной. Метастазы в костях были у 76,4 % пациенток в периферических лимфоузлах – у 17,6 %, в легких – у 17,6 %, в печени – у 5 %.

В группу сравнения вошли 23 пациентки ранним метастатическим раком молочной железы, которые не получали рекормон на фоне химиотерапии по схеме FАC. Состояние по шкале ECOG 1 степени из 23 больных было отмечено у 30,4 % больных, 2 степени – у 69,6 %. Ранее получали лечение по поводу рака молочной железы 65,3 % пациентов. Из них 48,0 % была выполнена операция и проведена химиолучевая терапия, 17,3 % – операция и лучевая терапия. У 9,0 % больных были метастазы в костях, у 73,9 % – в лимфоузлах, у 73,9 % – в легких, у 95,6 % – в печени, у 4,3 % – в головной мозг, у 30,4 % – в кожу, у 8,6 % – в мягкие ткани.

Рекормон в дозе 10000 БД вводился подкожно за сутки до начала химиотерапии, затем введения повторялись в той же дозе еженедельно в течение 6 нед. Больным обеих групп, имеющим костные метастазы, дополнительно проводилась терапия бифосфонатами путем внутривенной инфузии препаратов: зомета 4 мг в течение 30 мин или 2 мг бондроната в течение 2 ч.

Лабораторные показатели до начала терапии и после 6 недель лечения рекормоном для всех больных включали общий анализ крови (с подсчетом количества эритроцитов, ретикулоцитов, тром-

боцитов, уровня гемоглобина, гематокрита), биохимический анализ (концентрация сывороточного железа, общего белка, билирубина, трансаминаз, креатинина). На фоне лечения рекормоном еженедельно определяли общий анализ крови: ретикулоциты, тромбоциты, гемоглобин, гематокрит. Исходные параметры гемоглобина в двух группах были одинаковыми.

Результаты

Оценено влияние рекормона на динамику уровня гемоглобина при химиотерапии по схеме FАC у больных раком молочной железы путем сравнения двух групп больных, одна из которых (основная) получала рекормон, а другая (сравнения) – нет. После лечения число больных с уровнем гемоглобина 120 г/л и выше в основной группе было больше на 38,4 % ($p < 0,05$), чем в группе сравнения (см. таблицу).

Кроме того, в группе сравнения у 26,1 % больных уровень гемоглобина был ниже 100 г/л, чего не наблюдалось в основной группе. Только у 1 больной из группы получавших рекормон отмечена головная боль, у всех пациенток наблюдалось улучшение физического и эмоционального статуса.

Все это свидетельствует об эффективности рекормона в профилактике анемии у больных раком молочной железы, при проведении химиотерапии.

Таблица

Сравнительная оценка динамики уровня гемоглобина при химиотерапии по схеме FАC у больных раком молочной железы $T_1N_{1-3}M_{0-1}$ в зависимости от дополнительного применения рекормона

Уровни гемоглобина, г/л	Группы больных				
	основная (n – 17)		сравнения (n – 23)		
	абс. число	%	абс. число	%	P
до лечения					
от 70 до 80	–	–	–	–	–
от 80 до 100	3	17,6	1	4,3	>0,1
от 100 до 110	2	11,8	3	13,1	>0,5
от 110 до 120	7	41,2	11	47,8	>0,5
от 120 до 130	5	29,4	8	34,8	>0,5
после лечения					
от 70 до 80	–	–	2	8,6	–
от 80 до 100	–	–	4	17,4	<0,05
				P1>0,05	
от 100 до 110	4	23,5	8	34,8	>0,05
		P1>0,05		P1>0,5	
от 110 до 120	5	29,4	7	30,4	>0,05
		P1>0,05		P1>0,05	
от 120 до 130	8	47,1	2	8,7	<0,05
		P1>0,05		P1>0,05	
P – статистическая значимость различий между двумя группами; P1 – статистическая значимость различий в динамике в каждой группе больных.					

Клинический пример:

Больная, 41 лет. Диагноз: «Рак левой молочной железы T₁N₀M₀ после комплексного лечения в 2003 г., метастазы в легкие, мягкие ткани передней брюшной стенки, кости (2005 г.)».

В 2003 г. проведено следующее лечение: радикальная секторальная резекция левой молочной железы, лучевая терапия 60 Гр, 4 курса терапии по схеме FAC с адъювантной целью.

В феврале 2005 г. выявлено прогрессирование опухолевого процесса – метастатическое поражение грудного (Th10-12) и поясничного отделов отдела позвоночника (L2), метастазы в оба легких, экссудативный плеврит слева, метастазы (N2) на передней брюшной стенке до 1,0 см в диаметре.

Перед началом лечения показатели общего анализа крови были следующие: Эр – $3,5 \times 10^{12}/л$; Нв – 98 г/л, Ц.п – 0,9; тромбоциты – $229,4 \times 10^9/л$; лейкоциты – $4,9 \times 10^9/л$; эоз – 1 %; п – 2 %; с – 68 %; лимфоциты – 25 %; моноциты – 4 %, гематокрит – 33 %, содержание эритропоэтина в крови – 1,6 нг/мл; сывороточного железа – 20 мкмоль/л.

Пациентка с марта 2005 г. еженедельно получала рекормон по 10 тыс.ед. за сутки химиотерапии по схеме FAC и еженедельно, в течение 6 недель пациентке проведено 3 курса химиотерапии с интервалом 21 день.

Литература

1. Ludwig H., Bigregard G., Olmi P., Nortier J. European Cancer Anemia Survey (ECAS): prospective evaluation of anemia in over 15,000 cancer (CA) patients (pts) // Ann Oncol. – 2002. – 13(suppl.5). – 169 (A623PD).
2. Ludwig H. Epoetin in cancer-related anemia. – Nep Dail Transplannt, 1999.
3. Oberhoff C., Nery B. Recombinant human erythropoietin in the treatment of chemo-induced anemia and prevention of transfusion requirement associated with solid tumors: a randomized, controlled study // An Oncol. – 1998. – 9. – P. 255–60.
4. Olsson A.M., Svensson J.H. Erythropoietin treatment in metastatic breast cancer: effect on HB, quality of life and need of transfusion // Acta Oncol. – 2002. – 41(6). – P. 517–24.
5. Tsukuda M., Yuyana S. Effectiveness of weekly subcutaneous recombinant human erythropoietin administration for chemotherapy-induced anemia // Biotherapy. – 1998. – 11(1). – P. 21–5.
6. Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia // Semin Oncol. – 2001. – 28(Suppl.8). – P. 36–4.
7. Wood P.A., Hrushesky J.M. Cisplatin-associated anemia: An erythropoietin deficiency syndrome // J Clin Invest. – 1995. – 95. – P. 1650–9.

Материалы IX Всероссийской научной конференции
«ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ», Нижний Новгород, 18–19 мая 2010 г.

ТЕЗИСЫ

Х.А. Бигвава, Е.Г. Славина, А.И. Чертова,
Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, Л.Ф. Морозова,
З.Г. Кадагидзе

**ИНДУКЦИЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ
И АПОПТОЗА
В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМ
ПРИ КОМБИНИРОВАНИИ АЛЬНОРИНА
С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ
ПРЕПАРАТАМИ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задача исследования. Изучить взаимодействие *in vitro* отечественного рекомбинантного препарата фактора некроза опухоли альфа – альнорина (Ал) с противоопухолевыми препаратами, применяемые для лечения злокачественной меланомы, в индукции цитотоксического действия и апоптоза в клеточных линиях меланом.

Материалы и методы. В исследование включены 6 линий меланом человека – mel MTP, mel II, mel Ras, mel P, mel Is, mel Kog, полученные из операционного материала больных; противоопухолевые препараты – дакарбазин (DTIC) и кармустин (BCNU). Цитотоксическую

Через 6 недель показатели общего анализа крови: Эр – $3,8 \times 10^{12}/л$; Нв – 118 г/л, Ц.п – 0,91; ретикулоциты – 3 %; тромбоциты – $267,4 \times 10^9/л$; лейкоциты – $4,1 \times 10^{12}/л$, п – 1 %; с – 59 %; лимфоциты – 32 %; моноциты – 8 %, гематокрит – 34 %, содержание эритропоэтина в крови – 3,3 нг/мл; сывороточного железа – 24 мкмоль/л. На фоне лечения рекормоном уровень гемоглобина оставался стабильным. Все курсы пациентке проведены своевременно, гемотрансфузий не было. Кроме того, у пациентки улучшилось общее состояние, настроение, качество жизни. После 6 курсов ХТ (через 9 недель после отмены рекормона) уровень Нв у пациентки составил 122 г/л.

Заключение

Предложенный способ позволяет предотвращать и корректировать анемию у больных ранним метастатическим РМЖ, получающих ХТ 1 линии по схеме FAC, а также проводить профилактику путем применения рекормона, способствующего сохранению стабильного уровня показателей гемоглобина, что позволяло своевременно проводить курсы ХТ. Ни у одной пациентки не было гемотрансфузий, отмечено улучшение самочувствия, функционального и эмоционального статуса, а значит и улучшение качества жизни больных.

активность оценивали с использованием МТТ-теста, а апоптоз – методом фиксированного окрашивания пропидиумом иодида (PJ) и методом двойного прижизненного окрашивания с использованием Аннексина V-FITC в комбинации с PJ с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson).

Результаты. При исследовании линии меланом mel II, mel MTP, mel Kog оказались резистентны к цитотоксическому действию DTIC, а линии меланом mel Ras, mel P, mel Is – чувствительны. К цитотоксическому действию BCNU чувствительными оказались линии mel II, mel MTP, mel Is, а резистентными – mel Ras, mel P, mel Kog. Добавление Ал повышало цитотоксичность DTIC в отношении резистентных линий и в слабой степени в отношении чувствительных линий. Сходные закономерности обнаружены и для BCNU, Ал усиливал цитотоксическое действие BCNU только в отношении резистентных линий. Клетки mel II и mel MTP оказались резистентными к индукции апоптоза DTIC. Ал в концентрации 500 МЕ/мл усиливал индукцию апоптоза в клетках mel II, а в клетках mel MTP только в концентрации 1,56 МЕ/мл; в концентрациях 500 и 50 МЕ/мл он сам индуцировал в этих клетках высокий уровень апоптоза.

Клетки mel Ras и mel P были чувствительны к апоптоз-индуцирующему эффекту DTIC и Ал его не усиливал. Индукция апоптоза BCNU проявлялась максимально на клетках линий mel II, Mel MTP.

Однако Ал не усиливал апоптоз, индуцированный BCNU ни на чувствительных, ни на резистентных линиях.

Выводы. Было выявлено, что клетки меланом, происходящие от разных больных, отличаются различной чувствительностью к цитотоксическому и апоптоз-индуцирующему действию противоопухолевых препаратов, и Ал усиливает эту чувствительность только на резистентных, но не на чувствительных клетках.

А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина, Д.А. Носов, Е.С. Яковлева, З.Г. Кадагидзе

СУБПОПУЛЯЦИЯ CD8⁺CD28⁺CD11b⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ РАКОМ ПОЧКИ ПРИ ВАКЦИНОТЕРАПИИ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задача исследования. Оценить прогностическую значимость субпопуляции регуляторных CD8⁺CD28⁺CD11b⁺ Т-лимфоцитов периферической крови больных с диагнозом метастатический рак почки при вакцино-терапии зрелыми дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом.

Материал и методы. В исследование были включены больные метастатическим раком почки (n=15), получившие вакцинотерапию в терапевтическом режиме (по 6 вакцинаций).

У 5 больных (33,4 %) на фоне лечения была отмечена стабилизация процесса, у остальных 10 больных (66,6 %) – в процессе вакцинотерапии наблюдалось прогрессирование основного заболевания.

В качестве контрольной группы исследовали фенотип здоровых доноров (n=10).

Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови оценивали до начала вакцинотерапии в реакции иммунофлуоресценции с коммерческими МКА к CD45, CD8, CD11b и CD28 антигенам, конъюгированными FITC, PE, PE-Cy5 и APC, с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson).

Результаты. Субпопуляция регуляторных CD8⁺CD28⁺CD11b⁺ Т-лимфоцитов является минорной и составляет менее 3 % лимфоцитов периферической крови здоровых доноров.

При иммунологическом исследовании до начала лечения было выявлено, что у 33,3 % больных (n=5) количество CD8⁺CD28⁺CD11b⁺ Т-лимфоцитов составляло более 10 % (10–20 %) и на фоне лечения оставалось стабильным.

У 13,3 % больных (n=2) исходно эта субпопуляция была в пределах нормы, а после 3-й вакцинации составила более 10 %.

Проводимая вакцинотерапия для этих больных была не эффективна.

У остальных больных 53,3 % (n=8) субпопуляция регуляторных CD8⁺CD28⁺CD11b⁺ Т-лимфоцитов была в пределах нормы, как до начала терапии, так и в процессе лечения.

При этом у 3 больных в процессе вакцинотерапии было выявлено прогрессирование основного заболевания, тогда как у остальных больных (33,3 %) на фоне лечения наблюдалась стабилизация процесса.

Выводы. Полученные нами результаты позволяют рассматривать субпопуляцию регуляторных CD8⁺CD28⁺CD11b⁺ Т-лимфоцитов как показатель неблагоприятного прогноза и возможный критерий отбора больных для вакцинотерапии.

М.Д. Огородникова¹, Т.Н. Заботина², А.А. Борунова², Н.Ю. Очеева², З.Г. Кадагидзе², О.А. Рукавицын¹, А.Д. Онуфриевич¹

АКТИВАЦИЯ И АПОПТОЗ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ГАММА-ОБЛУЧЕНИИ

¹ГВКГ им. академика Н.Н. Бурденко, Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Технология гамма-облучения компонентов крови, в том числе, тромбоконцентратов (ТК), применяется для инактивации аллогенных Т-лимфоцитов с целью профилактики реакции трансплантат против хозяина, ассоциированной с гемотрансфузией. В России принятой дозой γ-облучения является 25 Грей.

Цель. Оценить функциональную состоятельность и жизнеспособность тромбоцитов на основании экспрессии маркеров активации и апоптоза при γ-облучении тромбоконцентратов в дозе 25 Грей.

Материалы и методы. Были исследованы 10 образцов ТК до и после γ-облучения. ТК получали на сепараторе клеток Amicus (Fenwal). Количество тромбоцитов в полученных дозах для обработки варьировало в диапазоне 2,5–3,5×10¹¹, объем ТК составлял 250–300 мл. γ-облучение выполнялось на установке БИОБИМ 8000 (VEBIG) в дозе 25 Грей в течение первых суток после тромбоцитафереза. Оценивали экспрессию фосфатидилсерина (PS) на поверхности тромбоцитов с помощью FITC-меченного Annexin V. Активацию тромбоцитов оценивали по экспрессии мембранного Р-селектина с помощью моноклональных антител anti-CD62P. Анализ образцов проводили методом проточной цитометрии (FACS Calibur, BD Biosciences) в первые 2 ч после облучения.

Результаты. Базовый уровень экспрессии поверхностного маркера активации CD62P на поверхности тромбоцитов, полученных от разных доноров, варьировал от 13,3 % до 44,7 % и составил 26,0±1,8 %. После γ-облучения в дозе 25 Грей достоверного повышения экспрессии CD62P не отмечено. Экстернализация фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов до обработки составляла не более 13,6 % (1,1–13,6 %). После γ-облучения повышение связывания с Annexin V наблюдалось лишь в некоторых образцах не более чем в 2,5 раза и не превышало максимального базового уровня.

Выводы. Изменений маркеров апоптоза и активации тромбоцитов, как показателей функциональной активности и жизнеспособности тромбоцитов, после гамма-облучения в дозе 25 Грей не было выявлено.

Е.Г. Славина, А.И. Черткова, Э.К. Шоуа, В.А. Нуртдинова, А.А. Борунова, Т.Н. Заботина, И.П. Ганьшина, К.Р. Зейналова, З.Г. Кадагидзе, М.Р. Личиничер

ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ ГЕРЦЕПТИНА НА КОЛИЧЕСТВО РЕГУЛЯТОРНЫХ CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-КЛЕТОК (ТРЕГ) У БОЛЬНЫХ РМЖ

С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ HER2/NEU

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Ранее нами было показано, что применение герцептина (Гц) приводит к уменьшению доли CD4⁺Т-клеток, экспрессирующих маркер CD25⁺, среди Т-лимфоцитов периферической крови больных РМЖ.

Целью настоящего исследования было определение изменения %-го содержания Трег у больных РМЖ, получавших терапию Гц в комбинации с химиотерапией, а также влияние проводимой терапии на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови.

Материалы и методы. В исследование были включены 15 больных РМЖ с IIIb, IIIc и IV стадиями болезни.

На I этапе лечения больные получали Гц в монорежиме еженедельно в течение 1 мес. На II этапе лечения Гц применялся совместно с химиотерапией. В последующем больные подвергались оперативному лечению. Популяционный состав лимфоцитов изучали цитофлюориметрией с использованием панели моноклональных антител к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Для определения количества Трег среди CD4⁺ лимфоцитов использовали Human Regulatory T cell Staining Kit (eBioscience). Кровь больных тестировали до лечения и после I и II этапов терапии.

Результаты и выводы. У 7 из 15 больных после I и II этапа лечения отмечалось заметное снижение количества CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Трег: 2,96±0,8 % (P=0,0088) после I и 2,28±0,75 % (P=0,029) после II этапа по сравнению с 6,9±1,6 % до лечения (Группа А). При этом количество CD4⁺CD25⁺ клеток практически не изменялось, а количество CD4⁺FOXP3⁺ снижалось с 5,51±1,26 % до 2,16±0,49 %, P=0,014). В то же время у 5 пациенток после монотерапии Гц % Трег повышался до 10,5±1,77 % по сравнению с 4,08±1,32 % до лечения (P=0,013) (Группа Б). Однако после II этапа лечения % этих клеток снижался практически до исходного уровня (3,39±2,03 %, P=0,043). У 3 больных % Трег после I этапа лечения практически не изменялся: 4,02±2,27 % и 3,93±2,16 % соответственно. Наблюдение за больными будет продолжено. По предварительным данным, снижение пропорции Трег наиболее характерно для больных с положительным клиническим эффектом лечения. Однако, учитывая разнообразие эффектов Гц на количество Трег клеток в достаточно ограниченной группе пациентов (15 человек), в дальнейшем необходимо расширить исследование, значительно увеличив число больных.

М.Н. Якунина, Е.М. Трещалина, А.А. Шимишрт
**РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ
ЭФФЕКТИВНОСТИ
АДЬЮВАНТНОЙ ХТ ДОКСОРУБИЦИНОМ
СПОНТАННОГО РМЖ СОБАК И КОШЕК**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Спонтанный РМЖ собак и кошек является одной из наиболее распространенных форм злокачественных новообразований домашних животных.

Определенные результаты при РМЖ кошек и собак дает послеоперационная (адьювантная) ХТ на основе антрациклинов. Опыт применения доксорубицина (Доксо) при лечении РМЖ у домашних животных имеется в КЭТ НИИ КО РОНЦ.

Цель работы – оценка эффективности Доксо при адьювантной ХТ РМЖ собак и кошек – пациентов КЭТ.

Материалы и методы. Ретроспективно проанализировано 100 историй болезни (ИБ) получивших лечение Доксо животных с верифицированным по TNM РМЖ III ст. В исследовании 54 кошки (50 самок и 4 самца) среднего возраста 12,6 [8÷16] лет, 13 стерилизованы. Группа контроля (n=18) получили оперативное лечение; группа эксперимента (n=36) получили Доксо после РМЭ. Исследованы данные 46 собак (41 самок и 1 самец) среднего возраста 11,2 [8÷15] лет, 10 стерилизованы. Группа контроля (n=15) получили оперативное лечение; группа эксперимента (31 собак) получили Доксо после РМЭ. Доксо 30 мг/м² вводили на 3–10 сут после РМ в/в капельно в течение 1 ч с премедикацией преднизолоном, супрастином и церукалом. Проведено 3 цикла с интервалом 21 день. Оценка эффективности выполнена по выживаемости, рассчитанной по СПЖ, МПЖ и МБП.

Результаты. РМЖ кошек. В группе контроля: МПЖ=4,2 мес, при этом 3 мес пережили 65,4 %, 6 мес –

36,8 %, 1 год – 5,3 % кошек; МБП=4,1 мес, 6 мес пережили 36,8 %, 1 год – 5,3 % кошек. В группе эксперимента: СПЖ=10,4 мес, МПЖ=8,7 мес, при этом 6 мес пережили 67,9 %, 1 год – 41,7 %, а 3 года – 12,6 % кошек; МБП=8,3 мес, при этом не имели метастазов первые 3 мес 90,1 %, 1 год – 33,1 %, а 3 года – 4,3 % кошек. **РМЖ собак.** В группе контроля: МПЖ=7,1 мес, при этом 6 мес пережили 56 %, 1 год – 46,7 %, а 20 мес – 7,8 % собак; МБП=7,1 мес., при этом 6 месяцев прожили 55 % собак, а 1 год – 35 %. В группе эксперимента: СПЖ=11,9 мес; МПЖ=18,6 мес, при этом 6 мес пережили 82,4 %, 1 год – 62,3 %, 20 мес – 41,7 %, а 3 года – 23,8 % собак; МБП=12,9 мес, при этом 6 мес не имели признаков метастазирования 83,2 %, 1 г – 56,4 %, а 3 г – 15,9 % собак.

Заключение. Проведенный анализ 100 историй болезни кошек и собак с РМЖ III ст. показал, что 3 цикла адьювантной ХТ Доксо в дозе 30 мг/м² позволяет достоверно (p<0,05) в 2–2,5 раза увеличить общую и безметастатическую выживаемость после радикальной мастэктомии.

*Т. Н. Заботина, О. В. Короткова, А. А. Борунова,
Н. Ю. Очеева, И. И. Бокин, К. И. Жордания,
И. В. Паниченко, В.В. Баринов, В. Ю. Сельчук,
В. В. Кузнецов, З. Г. Кадагидзе*

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования. Оценить взаимосвязь показателей иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови первичных больных РЯ с клиническим течением заболевания в процессе комбинированного лечения.

Материалы и методы. Включены 35 первичных больных РЯ (ср. возраст 53,9 года). Группа сравнения: 15 практически здоровых женщин 25–58 лет. На 1 этапе выполнялась стандартная операция, экстирпация матки с придатками+удаление большого сальника.

Большинству пациенток после гистологической верификации установлена III стадия заболевания, преобладал серозный вариант РЯ. ХТ по стандартной схеме ТС, 6 курсов. Многоцветное иммунофенотипирование лимфоцитов проводили до хирургического лечения с использованием коммерческих наборов МКА методом ПЦ (BD Biosciences, Beckman Coulter).

Результаты. У 42,9 % первичных больных РЯ содержится исходно нормальное количество CD3⁺ Т-клеток (1 группа), исходно сниженное у 35,7 % (2 группа) и исходно повышенное у 21,4 % (3 группа). С помощью 4-цветного ПЦА обнаружено: несмотря на исходно нормальное соотношение линейных популяций в 1 группе больных выявлена субпопуляция CD45+CD3⁺ Т-клеток, коэкспрессирующая маркеры NK-клеток CD16⁺ и CD56⁺, составляющая 15,2±2,1. Уровень NKT-клеток в этой группе превышал показатели доноров и показатели больных с низким и высоким CD3 – 6,0±1,4; 5,7±3,6; 8,7±1,1 соответственно. После проведения 6 курсов ХТ оценили клинические результаты лечения по группам. Стабилизация /ЧЭ выявлен у 50 % больных 1 группы (N CD3); в 40 % случаев во 2 группе (↓CD3) пациенток и у 50 % больных из 3 группы (↑CD3). Прогрессирование/летальный исход наблюдали у 50 % больных с исходно нормальным уровнем CD3 и в 20 % случаев среди больных 2 группы. Ремиссия/ПЭ зафиксированы только во 2 и в 3 группах пациенток – 40 % и 50 % соответственно.

Выводы. Выявленный нами высокий уровень NKT-лимфоцитов у первичных больных РЯ коррелирует с неблагоприятным клиническим течением заболевания в процессе комбинированного лечения.



Натан Танфелевич Райхлин К 85-летию со дня рождения

16 июня 2010 г. исполнилось 85 лет со дня рождения ведущего научного сотрудника лаборатории гистохимии и электронной микроскопии отдела патологической анатомии опухолей человека НИИ клинической онкологии Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора Натана Танфелевича Райхлина.

Н.Т. Райхлин со школьной скамьи был призван в действующую Красную армию, прошел тяжелый путь солдата-пехотинца, в боях был трижды ранен. Его воинские заслуги в годы Великой Отечественной войны отмечены многочисленными правительственными наградами. После демобилизации в 1945 г. Н.Т. Райхлин заканчивает школу и в 1946 г. поступает в I Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова, который окончил с отличием в 1952 г. До 1955 г. по распределению работает врачом-патологоанатомом в г. Караганде. В последующие 3 года по рекомендации проф. А.И. Струкова обучается в аспирантуре на кафедре патологической анатомии I ММИ им. И.М. Сеченова, после окончания которой с 1958 г. по настоящее время работает в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Еще со студенческой скамьи, а затем в аспирантуре Н.Т. Райхлин проявил серьезный интерес к патологической анатомии. Под влиянием своих учителей академиков РАМН А.И. Абрикосова и А.И. Струкова он начал формироваться как ученый. Последующая работа с академиком РАМН Н.А. Краевским сыграла большую роль в общетеоретической и практической подготовке Натана Танфелевича. Продолжив традиции учителей, он сумел найти в науке оригинальное направление и совместно с многочисленными учениками создать свою научную школу. Отличительной чертой юбиляра как ученого всегда было особое чувство нового в науке. Его интересы постоянно концентрировались на наиболее актуальных и малоизученных медико-биологических проблемах. Уже в первой опубликованной работе, выполненной в студенческом кружке, он применяет гистохимические методы, которые наряду с электронной микроскопией и иммуногистохимией становятся в дальнейшем основой его исследований. При непосредственной поддержке академика РАМН Н.А. Краевского в 1969 г. на базе отдела патологической анатомии опухолей человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН Н.Т. Райхлиным была организована лаборатория гистохимии и электронной микроскопии, которая стала заниматься разработкой наиболее перспективных направлений онкоморфологии.

Научная деятельность Н.Т. Райхлина обширна и многогранна. На протяжении 52 лет работы в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН он занимается всесторонним морфологическим изучением опухолей человека. Именно эти работы снискали ему заслуженное признание, авторитет и известность. В многочисленных научных трудах им показаны конкретные возможности применения гистохимических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических методов в исследовании особенностей клинического и биологического поведения новообразований. Изучение фундаментальных проблем злокачественного роста позволило Н.Т. Райхлину сформулировать положение о сохранении в опухолях органо-, ткане- и цитоспецифических ультраструктурных, гистохимических и иммуногистохимических признаков, что послужило теоретической базой использования этих методов в практической онкоморфологии с целью дифференциальной и гистогенетической диагностики новообразований, определения прогноза, их клинических особенностей. Эти исследования Н.Т. Райхлина и его учеников опубликованы в большой серии научных работ и ряде монографий («Ультраструктура раковых клеток», «Ультраструктура и гистохимия нормальных и опухолевых клеток», «Новые морфологические методы в онкологии», «Ультраструктура опухолей человека. Руководство для диагностики», «Ультраструктура гемопозитических клеток при лейкозах и лимфосаркомах», «Герминативные опухоли яичка») и др. Наряду с разработкой основных принципов электронно-микроскопической диагностики опухолей человека дальнейшее развитие получили иммуногистохимические работы, начатые еще 30 лет назад. Созданные рациональные схемы иммуногистохимической диагностики опухолей, регулярно проводимые по этой проблеме школы-семинары, а также многочисленные публикации и выход «Руководства по иммуногистохимической диагностике опухолей человека» (под редакцией С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина) способствовали внедрению иммуногистохимии в практическую работу патологоанатомов.

Одним из первых Н.Т. Райхлин приступил к систематическому изучению диффузной нейроэндокринной системы (АПУД-системы). Им совместно с сотрудниками и учениками впервые обнаружен синтез мелатонина в энтерохромаффинных клетках, серотонина в онкоцитах и ряда других гормонов в клетках этой системы, разработана номенклатура и классификация клеток, раскрыты механизмы так называемой эктопической продукции пептидных гормонов опухолями. Подробно и всесторонне изучены особенности нейроэндокринных опухолей, результаты этих работ обобщены в двух монографиях и многих статьях.

Важное значение имеют работы Н.Т. Райхлина, посвященные новым направлениям в изучении регуляции пролиферативной активности, в частности скорости прохождения клетками митотического цикла, множественной лекарственной устойчивости, роли апоптоза в механизмах канцерогенеза и регуляции роста опухолей, исследовании различных типов рецепторов, особенно соматостатина, в диагностике и лечении нейроэндокринных опухолей, новообразований другого гистогенеза, а также использование аналогов соматостатина в профилактике и лечении тяжелых послеоперационных осложнений и некоторых патологических состояний.

При участии Н.Т. Райхлина ведутся исследования по созданию новых противоопухолевых лекарственных средств, в частности, создан новый отечественный препарат Дикарбамин, обладающий противоопухолевыми и гемопротекторными свойствами при миелосупрессивной химиотерапии и нашедший применение в практической клинической онкологии. Н.Т. Райхлин – автор более 400 работ, 16 монографий, обладатель 8 дипломов на изобретения и открытия. Под его руководством защищена 51 диссертация, в том числе 15 докторских.

Многие работы Н.Т. Райхлина явились результатом плодотворного сотрудничества с учениками и учеными из различных городов России, СНГ, Германии, Франции, Венгрии, Болгарии, Польши и других стран.

Н.Т. Райхлин – член правления Российского и Московского научного общества патологоанатомов, Международного комитета по гистохимии и Международной академии патологии, лауреат премий им. А.И. Абрикосова и им. И.В. Давыдовского РАМН.

Свое 85-летие Натан Танфелевич Райхлин встречает в расцвете творческих сил, полный неиссякаемой энергии, энтузиазма и новых планов.

Сердечно поздравляем дорогого юбиляра и от всей души желаем ему крепкого здоровья, счастья, энергии, бодрости на долгие годы и новых успехов в научной работе.

*Коллектив Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН
Редакция «Российского биотерапевтического журнала»
Друзья и коллеги*

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЛС – антилимфоцитарная сыворотка
АТГ – антитимоцитарный глобулин
БКС – бинарная каталитическая система
ВРПС – водорастворимые полисахариды
ВЧД – внутричерепное давление
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
в/б – внутривенно
в/в – внутривенно
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома
бГК – быстрорастущая дедифференцированная гепатоцеллюлярная карцинома
мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная карцинома
ГПВ/GRV – гликопептидная противоопухолевая вакцина /glycopeptide cancer vaccine
ДМБА – диметил- α -бензантрацена
ЗНО – злокачественные новообразования
ЗО – злокачественное образование
ИДМ – иммунодефицитные мыши
ИФН- γ – интерферон гамма
ЛТ – лучевая терапия
МИБТ – медицинские иммунобиологические препараты
МЛ – мононуклеарные лейкоциты
ММ – метамиелоцит(ы)
МКА – моноклональные антитела
ММ – множественная миелома
МРЛ – мелкоклеточный рак легкого
МРТ – магнитно-резонансная томография
НК – натуральные киллеры
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества
НПТ – наилучшая поддерживающая терапия
НСПВС – нестероидные противовоспалительные средства
НХЛ – неходжкинская лимфома
ОбО – объективный ответ
ОДС – оптическая диффузионная спектроскопия
ОО – отсутствие ответа
ОКТ – оптическая когерентная томография
ОЦ – окисленный целлюлоз
ОЦК – объем циркулирующей крови
ОП – опухолевой плеврит
РМЖ – рак молочной железы
МР РМЖ – местнораспространенный рак молочной железы
ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма рака молочной железы
РЭС – ретикулоэндотелиальная система
ПВП – поливинилпирролидон
ПЛ – пролиферация и дифференцировка
ПЗ – прогрессирование заболевания
ПО – полный ответ
ПОПР – полиоксипропилен
ПФОС – перфторорганические соединения
ППК – первичные половые клетки
ПК – периферическая кровь
ПХТ – полихимиотерапия
ПЯ – палочкоядерный
КРР – колоректальный рак
РКТ – рентгеновская компьютерная томография
РЛ – рак легкого
РМП – рак мочевого пузыря
РМЖ – рак молочной железы
РПК – рак прямой кишки
РПЖ – рак поджелудочной железы
РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов
РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками
РШМ – рак шейки матки
СЗП – свежемороженая плазма
СПС – сосудисто-подобные структуры
СПЖ – средняя продолжительность жизни
СЯ – сегментоядерный
ТСХ – тонкослойная хроматография
ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография
ФГА – фитогемагглютинин
ФД – флуоресцентная диагностика
ФС – фотосенс
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ФСП – фармакопейная статья предприятия
ФТС – fetal calf serum (фетальная телячья сыворотка)
ХГ – хорионический гонадотропин
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз
ХТ – химиотерапия
ЛСП – лимфосаркома Плисса
ЦП – цисплатин
ЦФ – циклофосфан
ЧО – частичный ответ
ШМ – шейка матки
ЭФР – эпидермальный фактор роста
СОХ – циклооксигеназа
EPR effect – enhanced permeability and retention effect (эффект повышения проницаемости и удерживания)
LDCl – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingardon
LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюис)
Mw – molecular weight (молекулярный вес)
HER – human epidermal growth factor receptor
TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

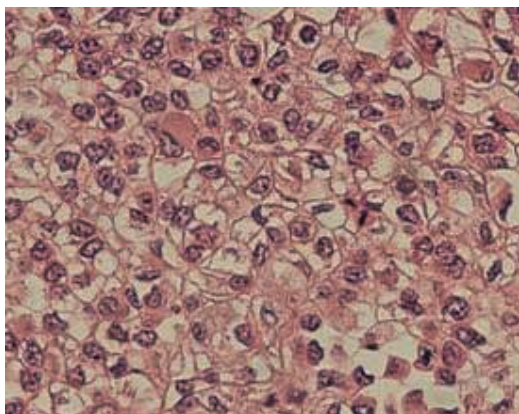


Рис. 2. П/к ксенографт SKOV-3: 3 пассаж, 22 сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 20$.

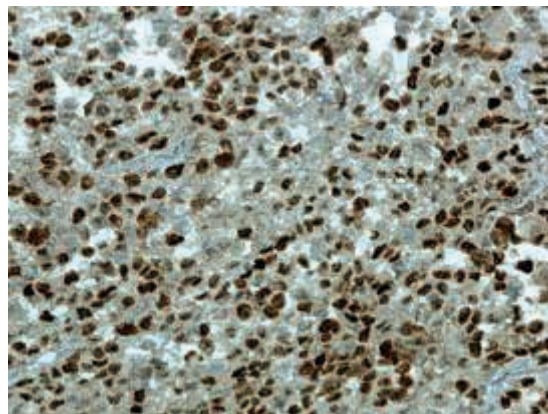


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание срезов п/к ксенографтов SKOV3 (3 пассаж) антителами к Ki-67, $\times 20$.

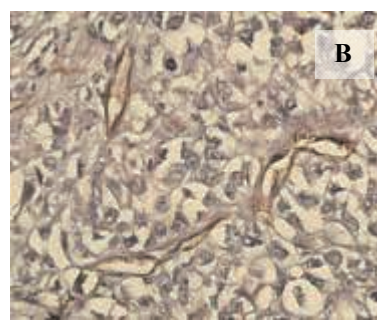
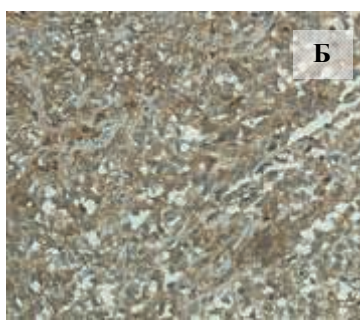
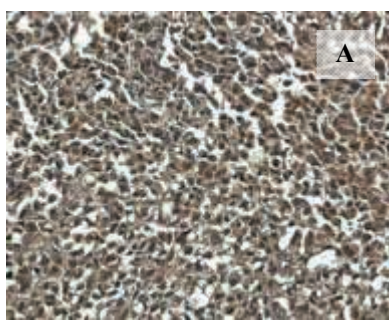


Рис. 6. Иммуногистохимическое окрашивание срезов п/к ксенографтов SKOV-3 антителами на HIF-1 α $\times 20$ (А), VEGF $\times 20$ (Б), CD31 $\times 40$ (В).

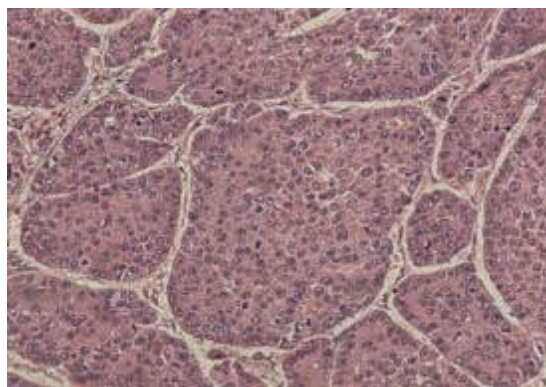


Рис. 8. П/к ксенографт T47D, 3 пассаж, 22 сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 20$.

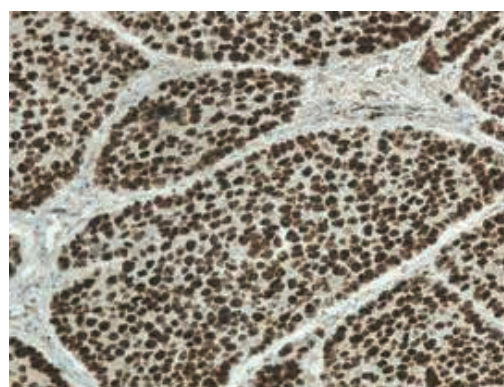


Рис. 9. Иммуногистохимическое окрашивание срезов п/к ксенографтов T47D (3 пассаж) антителами к Ki-67, $\times 20$.

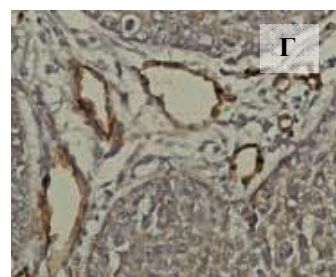
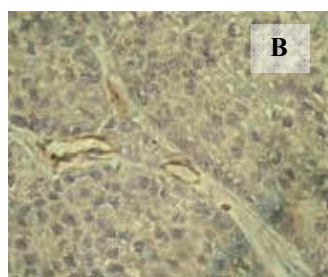
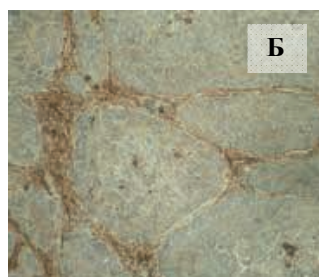
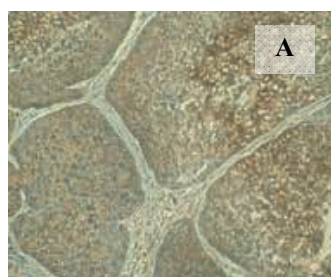


Рис. 12. Иммуногистохимическое окрашивание срезов п/к ксенографтов T47D антителами на HIF-1 α $\times 20$ (А), VEGF $\times 20$ (Б), VEGFR-3 $\times 40$ (В), CD31 $\times 40$ (Г).

«ТАКСОТЕР И ДОКСОРУБИЦИН В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ДИФФУЗНОГО И ИНФИЛЬТРАТИВНО-ОТЕЧНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СОБАК. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ»

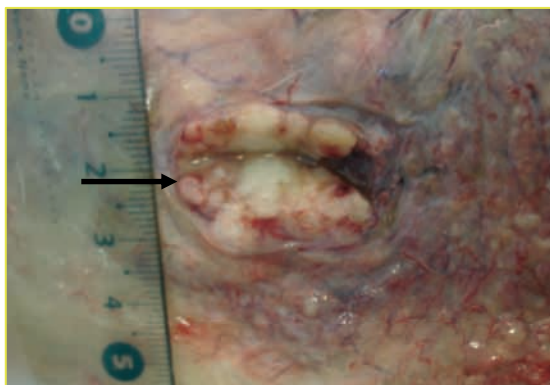


Рис. 1. Диффузно-распространенный РМЖ. Очаг некроза в опухоли.

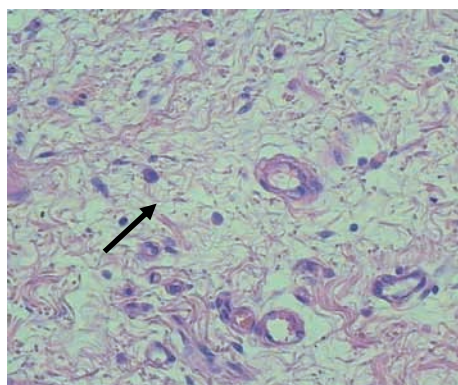


Рис. 2. Диффузно-распространенный РМЖ. Зона формирования волокнистой соединительной ткани в опухоли. Гематоксилин-эозин. ×20.

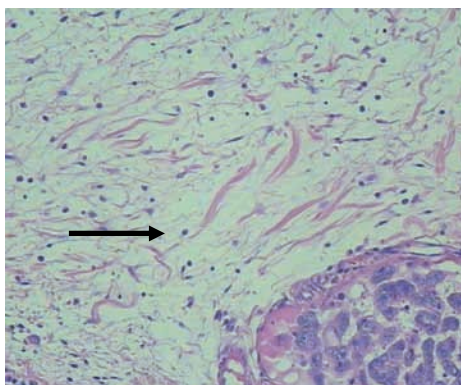


Рис. 3. Диффузно-распространенный РМЖ. Коллагеновые волокна с рыхло расположенными клетками опухоли, выраженный отек ткани. Гематоксилин-эозин. ×10.

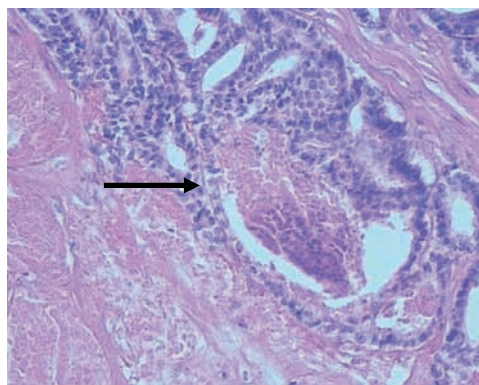


Рис. 4. Диффузно-распространенный РМЖ. Образование очагов некроза и некробиоза в паренхиме опухоли. Гематоксилин-эозин. × 20.

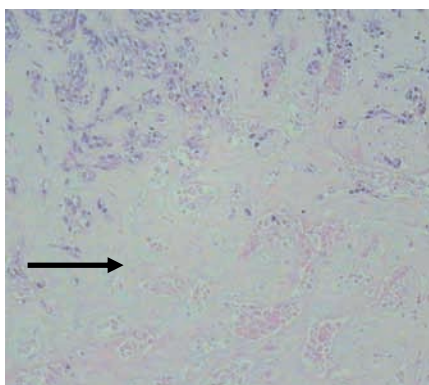


Рис. 5. Диффузно-распространенный РМЖ. Зона некроза опухоли. Опухолевые клетки без ядер. Гематоксилин-эозин. ×10.

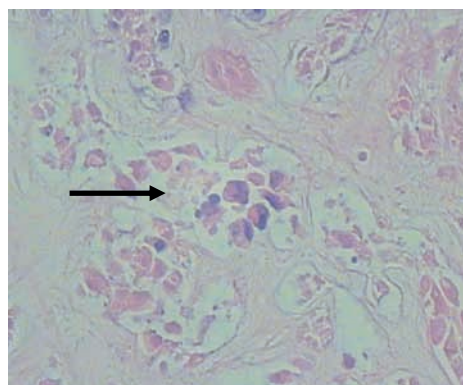


Рис. 6. Диффузно-распространенный РМЖ. Некробиоз, опухолевые клетки в состоянии дистрофических изменений, выраженная деформация ядер. Гематоксилин-эозин. ×40.

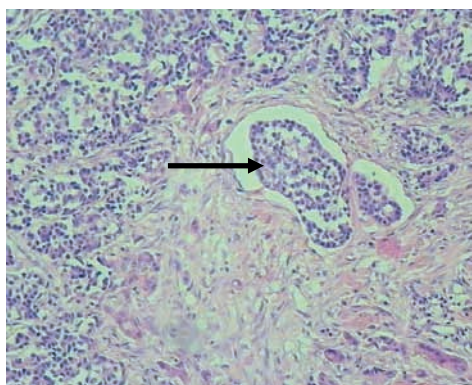


Рис. 7. Диффузно-распространенный РМЖ. Некробиоз. Опухолевый эмбол в просвете лимфатического сосуда. Гематоксилин-эозин. ×10.

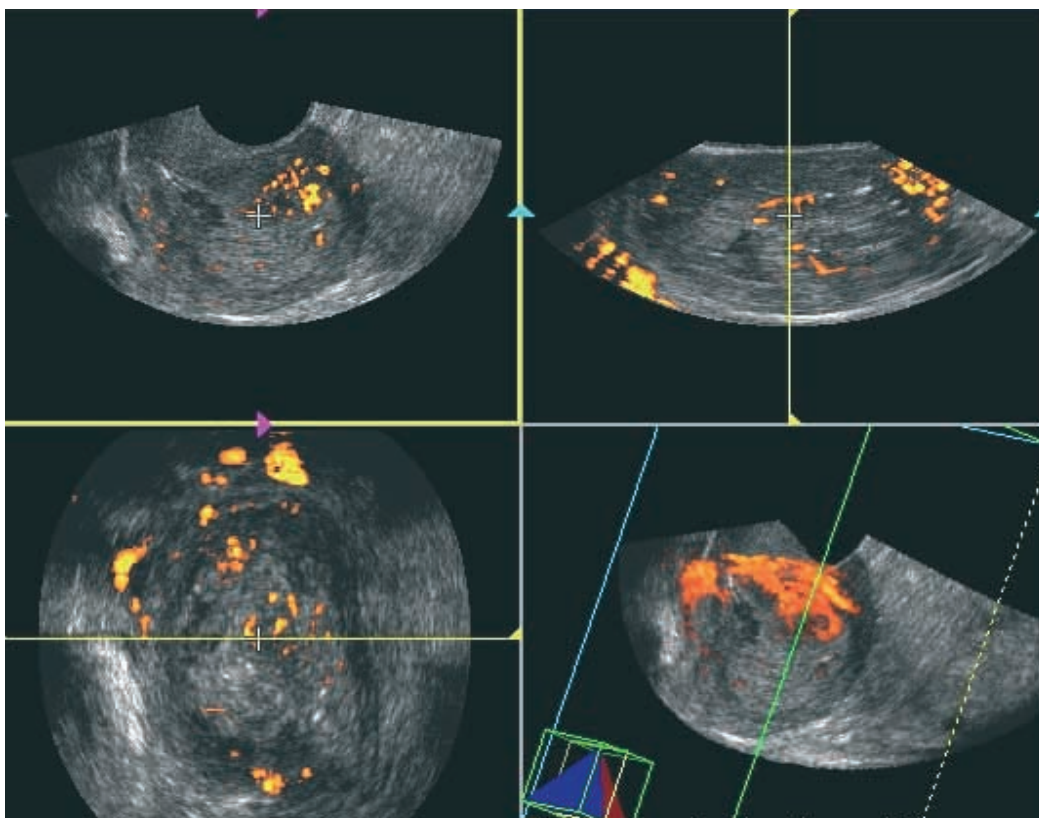


Рис. 1. УЗ-томограмма аденокарциномы эндометрия в трех взаимноперпендикулярных плоскостях при трехмерном режиме сканирования полости матки.

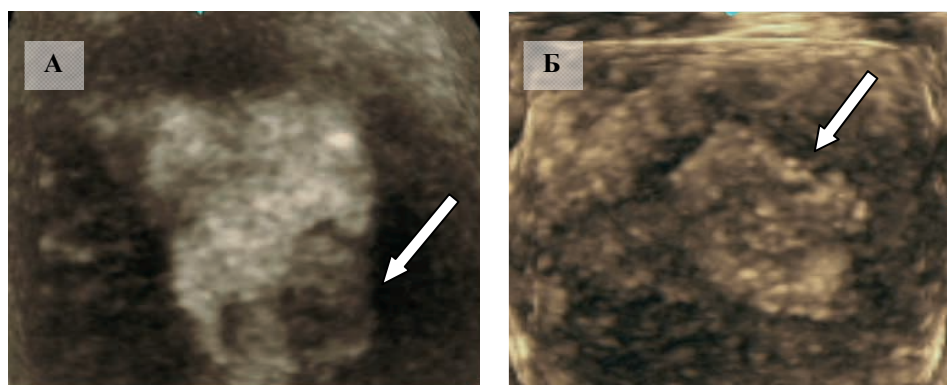


Рис. 2. Трехмерная УЗ-томограмма аденокарциномы эндометрия: А – пациентка Д.; Б – пациентка А.

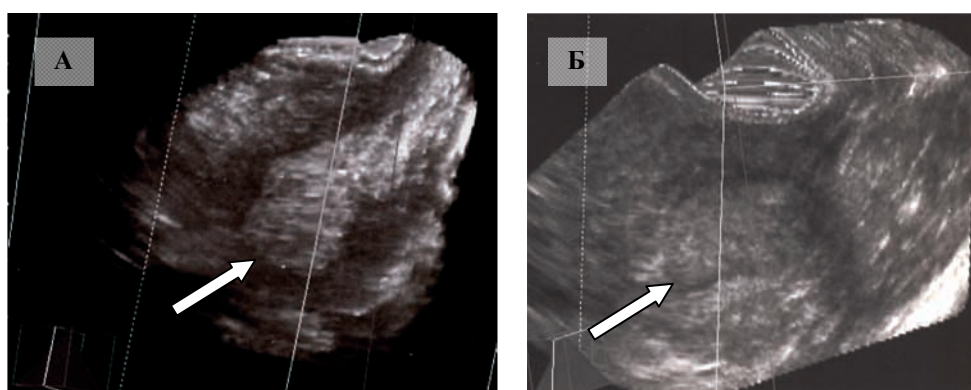


Рис.3. Трехмерная УЗ-томограмма умереннодифференцированной аденокарциномы эндометрия: А – пациентка Н.; Б – пациентка В.

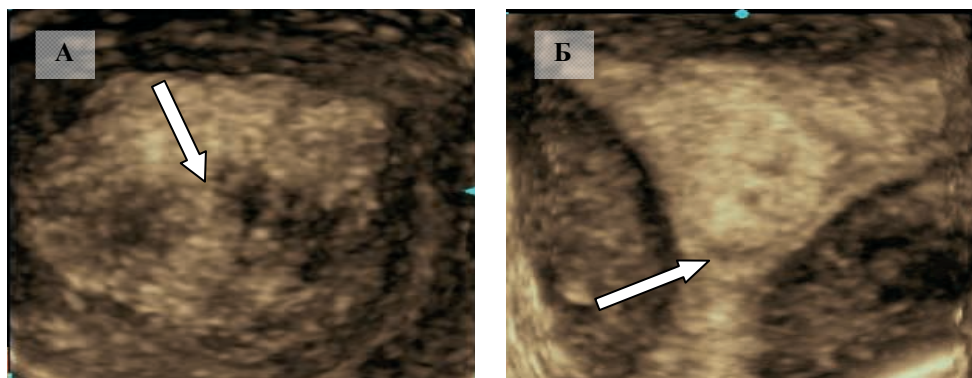


Рис. 4. Трехмерная УЗ-томограмма высокодифференцированной аденокарциномы эндометрия:
А – Опухоль занимает 2/3 полости в поперечной плоскости;
Б – Умереннодифференцированная аденокарцинома эндометрия.

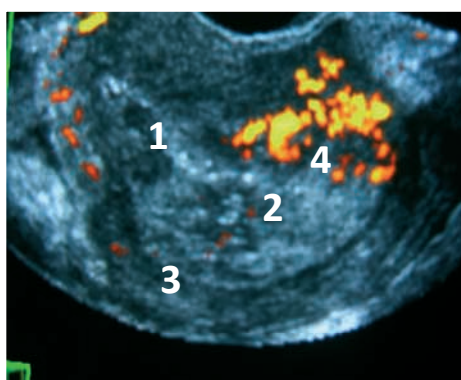


Рис. 5. УЗ-томограмма:

1. Опухоль занимает всю полость;
2. Значительное утолщение срединных маточных структур;
3. Отчетливо визуализируется гипоехогенный ободок, неровная граница (признаки инвазии);
4. Патологическая васкуляризация на границе опухоль/эндометрий.

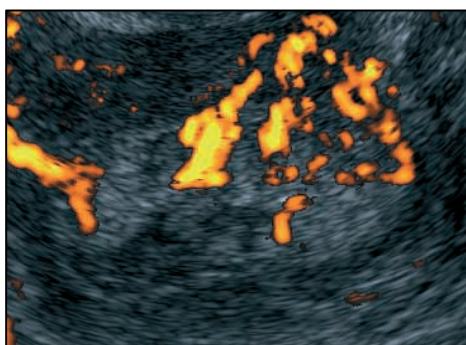


Рис. 6. Трехмерная ангиограмма опухоли тела матки.

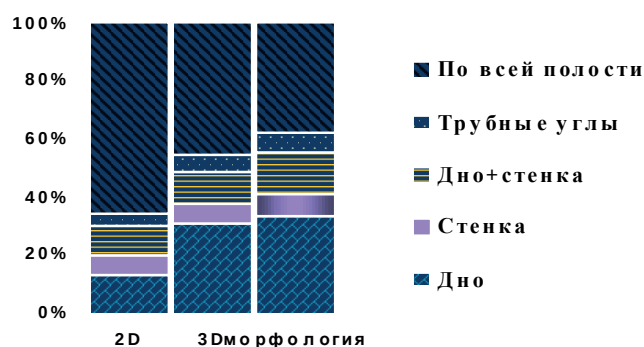


Рис. 7. Преимущества 3D томографии в определении локализации РТМ.

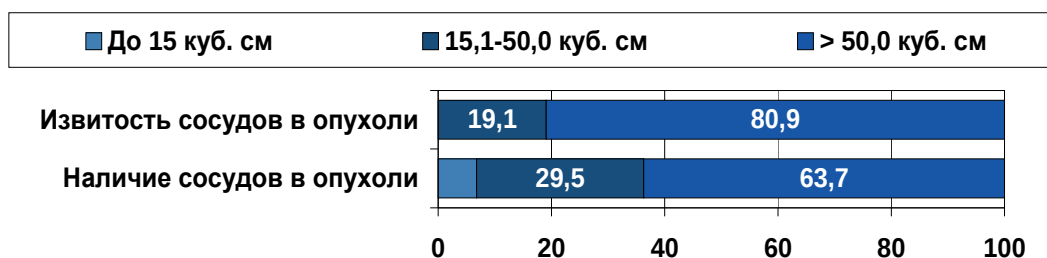


Рис. 8. УЗ-признаки патологического кровотока и объем опухоли при РТМ.

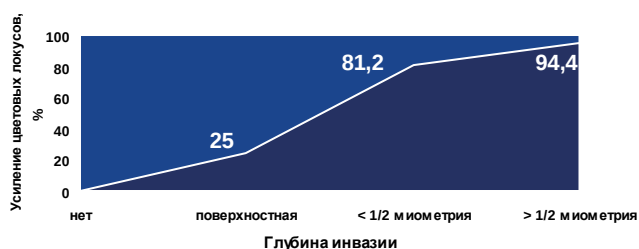


Рис. 9. УЗ-картина увеличения количества цветковых локусов на границе опухоли и миометрия при РТМ.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

**ЭНЦИКЛОПЕДИЯ
КЛИНИЧЕСКОЙ
ОНКОЛОГИИ**

**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**



МИРОВОЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА В ОБЛАСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Компания Applied Biosystems (часть корпорации Life Technologies) с более чем 30-летней историей является мировым лидером в производстве самого современного оборудования и реактивов для анализа белков, ДНК и РНК.

- Все для выделения, транспортировки и хранения ДНК, РНК, miRNA, siRNA;
- Амплификаторы ДНК;
- Термоциклеры для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени;
- Более 3,5 млн. тест-систем TaqMan (праймеры и зонды) для генотипирования (анализ SNP);
- Более 800 тысяч тест-систем TaqMan (праймеры и зонды) для изучения экспрессии генов;
- Платформа для высокопроизводительного анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и экспрессии генов TaqMan Open Array;
- Генетические анализаторы для секвенирования и фрагментного анализа;
- Системы для генотипирования микроорганизмов MicroSeq;
- Система высокопроизводительного секвенирования нового поколения SOLiD.

Все для диагностики наследственных и онкологических заболеваний, вирусных и бактериальных инфекций, HLA-генотипирования, судебной медицины (определения отцовства и идентификации личности), а также эпидемиологии, генетики, биотехнологии.

ООО Агентство Химэксперт
(официальный дилер Applied Biosystems)
123557, г. Москва, ул. Климашкина, 22, стр.1, офис 87
тел.: (499) 255-92-57
факс: (499) 252-51-64
www.khimexpert.ru
info@khimexpert.ru

Московское представительство Applied Biosystems:
117485, г. Москва, ул.Обручева, 30/1
тел.: (495) 651-67-97
факс: (495) 651-67-99
www.appliedbiosystems.ru

