

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№1 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. Батуриная,
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 19.03.2010
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

АБИСИЛИН®

Лацарус Л.А., Барышников А.Ю.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ТЕРПЕНОИДЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ..... 3

Лацарус Л.А., Пинигина Н.М., Барышников А.Ю., Огородникова М.В.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК..... 9

Лацарус Л.А., Пинигина Н.М., Барышников А.Ю., Степанова Е.В.

АНТИАНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® IN VITRO И IN VIVO..... 13

Лацарус Л.А., Пинигина Н.М., Смирнова З.С., Барышников А.Ю.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН®..... 17

Лацарус Л.А., Пинигина Н.М., Смирнова З.С., Барышников А.Ю.

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® В КОМБИНАЦИИ С ЦИСПЛАТИНОМ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ..... 21

Лацарус Л.А., Пинигина Н.М., Козлов А.М., Барышников А.Ю.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® НА ПРОЦЕСС СПОНТАННОГО РЕЦИДИВИРОВАНИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС МЫШЕЙ..... 25

Лацарус Л.А., Пинигина Н.М., Козлов А.М., Барышников А.Ю.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® НА ПРОЦЕСС ИСКУССТВЕННОГО РЕЦИДИВИРОВАНИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС МЫШЕЙ..... 29

Лацарус Л.А., Березовская И.В., Рымарцев В.И., Пинигина Н.М.

ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ..... 35

Лацарус Л.А.

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕРПЕНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ..... 39

БИОТЕРАПИЯ

Михайлова Т.В., Барышников М.А., Бутова О.С., Морозова Л.Ф., Михайлова И.Н., Барышников А.Ю.

СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ HSP70 НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ..... 43

Соколова Д.В., Степанова Е.В., Голубева В.А., Трещалина Е.М., Барышников А.Ю.

ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК..... 49

Соколова Т.М., Соколова З.А., Рубцова М.А., Барышников А.Ю.

ЭКСПРЕССИЯ ИНТЕРФЕРОНЗАВИСИМЫХ И АПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ DU145: ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ИНТЕРФЕРОНОВ И ИХ ИНДУКТОРОВ – ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК..... 53

Ермакова Н.П., Михайлова И.Н., Меркулова И.Б., Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Абрамова Т.В., Барышников К.А., Михайлова Л.М.

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ «МЕЛАВАК»..... 57

Михайлова И.Н., Иванов П.В., Петенко Н.Н., Барышников К.А., Морозова Л.Ф., Бутова О.С., Черемушкин Е.А., Субраманиан С., Чкадуа К.З., Барышников А.Ю., Демидов Л.В.

ВНУТРИКОЖНАЯ КЛЕТОЧНАЯ РЕАКЦИЯ НА ФОНЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ..... 63

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Кудинова Н.В., Березов Т.Т.

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ: ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ЛЕЧЕНИЯ..... 69

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В.

РОЛЬ КАРОТИНОИДОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ..... 77

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

Чекалова М.А., Мнацаканян Л.К., Кузнецов В.В., Захарова Т.И., Дворова Е.К., Камаева О.В., Кузумова А.А.

ВОЗМОЖНОСТИ ЭХОГРАФИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАЗОВ ЛЕЙОМИОСАРКОМЫ ТЕЛА МАТКИ..... 87

Шаназаров Н.А., Сабиров А.Х., Сияжков А.Г., Симонов А.В., Райков Н.С., Сидоров Е.В., Велижанина О.С.

ЗНАЧИМОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА..... 91

Т.Т. Березов, Л.К. Овчинникова, О.М. Кузнецова, З.К. Карабекова, И.К. Воротников, М.В. Гришкевич, А.А. Тулеуова, И.В. Терешкина, У.Р. Мамедов, Е.К. Дворова

VEGF В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ..... 100

К 90-летию со дня рождения С.П. Ярмоненко..... 100

Список сокращений..... 102

Правила оформления статей..... 12; 24; 34; 42; 48; 68

АБИСИЛИН®

УДК 615.322:616-006-085.277.3

Л.А. Лацерус¹, А.Ю. Барышников²

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ТЕРПЕНОИДЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ

¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация

Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: initium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

В этом обзоре мы обсуждаем информацию о противоопухолевой активности различных групп веществ из класса терпеноидов растительного происхождения, в том числе – полученных из хвойных деревьев семейства *Pinaceae*.

Ключевые слова: лекарственные растения, терпеноиды, противоопухолевое действие.

L.A. Latserez, A.Yu. Baryshnikov

THE POTENTIAL ANTICANCER ACTIVITY OF VEGETABLE TERPENOIDS

¹Initium-Parm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

Abstract

In this review we discuss the anticancer activity of different groups of terpenoids obtained from coniferous trees, particularly from *Pinaceae*.

Key words: medicinal plants, terpenoids, anticancer activity.

Введение

В настоящее время при разработке лекарственных методов предупреждения и лечения злокачественных опухолей особый интерес представляют биологически активные природные соединения растительного происхождения [6; 9; 32].

Среди них значительное место отводится веществам класса терпеноидов (изопреноидов), которые обладают широким спектром фармакологической активности и практическим отсутствием побочных эффектов, что позволяет применять их в профилактике и комплексной терапии заболеваний различных систем организма [12; 17].

Анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует об эффективности использования лечебных свойств природных терпеноидов, а также о возможности их применения при онкологических заболеваниях [10; 27; 47; 52; 56; 59]. Противоопухолевые свойства выявлены у таких известных соединений терпеноидной структуры и их производных как, например, таксаны, бетулиновая кислота, лимонен, ретиноиды, витамины А, Д и Е.

Одним из основных источников получения терпеноидов являются такие лекарственные растения, как хвойные породы деревьев семейства *Pinaceae* (сосна, ель, пихта, лиственница), которые по количественному содержанию и качественному составу терпеновых соединений многократно превосходят другие виды, широко распространенные в растительном мире [21; 28].

Наличие противоопухолевой активности у терпеноидов, полученных от многих видов растений, свидетельствует о перспективности их изучения для использования в качестве средств, повышающих противоопухолевую резистентность организма и эффективность лечения онкологических заболеваний.

Цель настоящего обзора – попытка оценить различные структурные группы растительных терпеноидов в плане их возможного использования для разработки противоопухолевых препаратов.

Биорегулирующие и терапевтические свойства соединений терпеноидной структуры

Известно, что большую группу действующих веществ растений составляют терпеноиды – углеводороды, состоящие из многих так называемых изопреновых единиц (C_5H_8) и в зависимости от их количества относящиеся к моно-, сескви-, ди-, три-, тетра- и поли-терпенам. Эта многочисленная группа веществ, насчитывающая более 23 тыс. соединений с установленным химическим строением, превосходит по числу представителей все другие классы природных соединений. Терпеноиды представлены альдегидами, кетонами, спиртами, эфирами, лактонами и другими соединениями. Эти вещества защищают растения от болезней и вредителей, а также – от многих стрессовых факторов окружающей среды (перегрева, охлаждения, механических повреждений, техногенного загрязнения и т.д.), т.е. они помогают растениям в выживании в различных экологических условиях [2; 20; 28; 33; 35; 53].

Вплоть до 1960-х гг. терпеновым соединениям отводилась второстепенная роль и их считали побочными продуктами «тупикового» звена в обмене ключевых предшественников. Чаще всего они рассматривались как вторичные, бесполезные вещества, которые с чрезвычайной расточительностью синтезируются растениями, но при этом не несут никакой функциональной нагрузки [12; 19].

В настоящее время получены убедительные данные об участии терпеноидных соединений во многих биохимических процессах, обеспечивающих жизнеспособность растений, животных и человека. Некоторые терпеноиды регулируют активность генов растений, участвуют в процессах фотосинтеза и переноса электронов в дыхательной цепи. Они играют ключевую роль в защите фотосинтетического аппарата клеток от активированного кислорода, в стабилизации растительных мембран и в контроле их проницаемости. Участие терпеноидов в репаративных процессах имеет огромное значение для сохранения жизнедеятельности растений в экстремальных условиях. Одним из механизмов репарации растений является выделение смол и балзамов, обладающих антисептическими свойствами и препятствующих внедрению патогенной микрофлоры [2; 12; 21; 33].

Терпеноидные соединения чаще всего липофильны по своей природе и выполняют в клетках самые разнообразные функции. Поразительно разнообразие процессов развития и обмена в живых организмах, в регуляции которых принимают участие метаболиты мевалоновой кислоты – специфического предшественника всех терпеноидов. Важную роль в процессах передачи сигнала деления клетки играют пренилированные белки. На долю этих белков с присоединенным остатком таких важных терпеноидов как фарнезилдифосфат и геранилгеранилдифосфат приходится до 5 % всех клеточных белков человека. Углеводные цепи отдельных терпеноидов являются начальными или промежуточными продуктами на пути биосинтеза ряда биологически активных веществ – холестерина, убихинона, сквалена, долихола, стероидных гормонов, некоторых ферментов, витаминов А, Д, Е, К, желчных кислот [19; 28]. В клетке, пожалуй, нет такого класса химических веществ, представители которого не участвовали бы в образовании производных с терпеноидами. Благодаря конформационной гибкости и полифункциональности многие терпеноиды легко вступают в разнообразные внутри- и межмолекулярные превращения. Видимо поэтому выдающийся русский ученый Е.Е. Вагнер, внесший большой вклад в изучение терпеноидов, назвал эти соединения «химическими хамелеонами».

Хотя терпеноиды похожи по своему строению и имеют один и тот же углеводный «скелет», даже небольшие отличия в структуре молекулы приводят к существенным различиям в физиологических свойствах и биологической активности. Некоторые представители этого класса соединений обладают антимикробным, противовоспалительным, болеутоляющим, регенерирующим, иммуномодулирующим, седативным, спазмолитическим, гипотензивным и другими действиями. Поэтому они являются перспективными природными источниками для получения высокоэффективных препаратов при лечении различных патологий [1; 14; 17; 18].

Противоопухолевая активность растительных терпеноидов

В последние десятилетия некоторые представители различных структурных групп природных терпе-

новых соединений (моно-, сескви-, ди- и тритерпеноиды) были изучены на наличие способности оказывать противоопухолевое действие.

Монотерпеноиды

Имеются сообщения о противоопухолевой активности отдельных монотерпеноидов, содержащихся в высоких концентрациях в эфирных маслах некоторых растений.

Так, выявлен противоопухолевый эффект у d-лимонена и его производных (перилловый спирт, гидропирилловая кислота) – основного терпенового компонента цитрусовых растений, который связывают с их способностью ингибировать *gas*-активность протеинов и синтез ДНК, вызывать подавление посттрансляционной модификации сигнальных белков, инициировать апоптоз и дифференцировку клеток опухоли [34; 43; 44; 51].

Подобное противоопухолевое действие наблюдали у гераниола, одного из важнейших монотерпенов, участвующего в начальном этапе мевалонатного пути биосинтеза терпеноидов [51].

Кроме этого, в опытах *in vitro* установлено, что гераниол при обработке клеток рака толстой кишки человека Сосо-2 вызывал 70 %-ное ингибирование роста, 50 %-ное ингибирование орнитиндекарбоксилазы (ключевого фермента синтеза полиаминов) и ингибирование синтеза ДНК [42].

В экспериментах на животных с перевиваемыми опухолями доказана возможность тормозить рост опухолей, существенно ингибировать процесс метастазирования при удалении опухолевого узла и повышать эффективность цитостатического лечения препаратами из растений Сибири и Дальнего Востока, в том числе – при воздействии эфирного масла пихты сибирской (*Abies sibirica* L.), содержащего в качестве основных действующих веществ большой набор монотерпенов (α - и β -пинен, камфен, лимонен, мирцен, борнилацетат, камфора и другие).

На основании проведенных исследований авторы обосновывают общие подходы к разработке новых способов фармакологического воздействия на процесс метастазирования опухолей с использованием средств растительного происхождения, повышающих эффективность химиотерапии и хирургического лечения больных со злокачественными опухолями, и выделение их в новую группу препаратов – антиметастатиков [3; 8].

Сесквитерпеноиды

К настоящему времени известно более 200 сесквитерпеноидов из растений с выраженной противоопухолевой активностью [1; 28; 53].

Структурная схожесть сесквитерпеноидов с клеточными изопреноидами делает их привлекательными для разработки ингибиторов пренилирования белка, особенно ингибирования фарнезилтрансферазы и онкогенно-активированного *gas*-протеина, позволяющее блокировать присоединение белков Ras к клеточной мембране [25; 36; 50; 60].

Вызывают интерес выявленные противоопухолевые свойства у сесквитерпенового лактона гвайанового типа – арглабина, представляющего собой производное фарнезилпирофосфата (предшественника биосинтеза сесквитерпенов), который является субстратом фарнезилтрансферазы и имеет структурную схожесть с клеточными полипренолами белков цитоплазмы. В экспериментах показано, что этот сесквитерпен, полученный из надземной части полыни гладкой (*Artemisia glabella*), ингибирует фарнезилтрансферазу и индуцирует апоптоз опухолевых клеток.

Арглабин проявил выраженную противоопухолевую активность в отношении таких трансплантируемых опухолей крыс и мышей, как лимфосаркома Плиса, саркомы М-1, карциносаркома Уокера (72–79 % ТРО), альвеолярного слизистого рака печени крыс РС-1 (60 % ТРО), лимфоцитарной лейкемии Р-388 (УПЖ – 142 %), лимфоидной лейкемии Li210 (УПЖ – 84 %), солидной опухоли Эрлиха, LLC, аденокарциномы молочной железы Са-755, саркомы-37 (86–90 % ТРО), саркомы-180 (70 % ТРО). Результаты клинических исследований указывают на значительную противоопухолевую активность препарата арглабин при лечении больных с опухолями разной локализации и диссеминацией опухолевого процесса, в том числе – в комбинации с лучевой терапией или ПХТ [25; 37].

Известно, что ингибиторы фарнезилтрансферазы не только способны возвращать Ras-трансформированные клетки к нормальному фенотипу, но и вызывать регрессию опухоли и ингибировать сигнальные пути Ras/MAPK (митогенактивируемой протеинкиназы) и P1-3K (фосфоинозитол-3-киназы). Ингибиторы фарнезилтрансферазы в основном затрагивают только клетки с выраженной экспрессией онкогена Ras, но подвергая воздействию нормальные клетки [13; 58; 60]. Можно предположить, что ингибиторы фарнезилтрансферазы на основе сесквитерпеноидов растительного происхождения могут оказаться перспективными агентами для направленной терапии рака.

Дитерпеноиды

Весьма эффективными в качестве противоопухолевых средств оказались дитерпеноиды сложного строения – таксаны, впервые выделенные в 1971 г. из коры тихоокеанского тиссового дерева (*Taxus brevifolia Nutt.*). Полученный на их основе препарат паклитаксел (таксол) и полусинтетический аналог доцетаксел (таксотер) из европейского тисса (*Taxus baccata*), в последние годы широко используется при лечении рака яичников и молочной железы, а также других видов опухолей [5; 39; 45; 52; 56].

К настоящему времени на моделях экспериментальных опухолей и клиническом материале расшифрован уникальный антимиотический механизм действия этих представителей таксанового семейства дитерпеноидов [48; 61]. Таксановые соединения стимулируют полимеризацию клеточного белка тубулина, что вызывает нарушение микротрубочного аппарата клетки. При этом микротрубочки теряют способность распадаться и не способны формировать клеточное веретено в фазах G₂ и М. Следствием нарушения функционирования внутритрубочного аппарата клетки является не только блокирование процесса деления и синтеза цитокинов в этих клетках, но и повреждение скелета клетки, нарушение ее подвижности, внутриклеточного транспорта и передачи трансмембранных сигналов.

В связи с дефицитом исходного сырья для получения противоопухолевых препаратов с таксановым кольцом продолжается поиск новых таксолсодержащих субстанций. Так, для их выделения использовали биомассу культивируемых клеток *Taxus baccata*. Полученные разными способами таксолсодержащие извлечения оказывали ингибирующее действие в отношении роста опухоли на модели перививаемой мышшиной меланомы В-16 [29]. Причем наибольший противоопухолевый эффект был зарегистрирован у экспериментальных животных, получавших внутрибрюшинно таксолсодержащий экстракт, растворенный в персиковом масле (торможение

роста опухоли к 38-му дню составляло 90 %). Введение данной субстанции экспериментальным животным приводило к регрессии опухолевой ткани у 50 % леченых мышшей с меланомой В-16. Обнаружено также существенное увеличение средней продолжительности жизни леченых животных по сравнению с нелеченными (на 30–60 %). Лечение изученными таксолсодержащими извлечениями приводило к возрастанию активности антиоксидантных ферментов в печени экспериментальных животных, обуславливая нормализацию регуляции процессов метаболизма кислорода в тканях.

В последние годы для получения таксолсодержащих субстанций предложено использовать живицу хвойных пород деревьев, таких как пихта, кедровая сосна и лиственница [26], из которой выделяют фракцию лабданоидо-дитерпеновых кислот, добавляя камфару и воздействуют на полученную смесь γ -излучением до формирования структуры R-тетраола – аналога таксола. Анализ противоопухолевой активности R-тетраола, полученного из живицы хвойных деревьев, показал, что данный препарат не уступает по противоопухолевым свойствам зарубежным аналогам – Таксолу (производства «Bristol Mayers Squibb», США), и значительно превосходит его аналог Паклитаксел (производство «Ebewe», Австрия).

Тритерпеноиды

Среди растительных тритерпеноидов различных структурных типов обнаружено более 100 соединений, обладающих противоопухолевыми свойствами [57]. В частности, среди природных лупановых тритерпеноидов весьма перспективными противоопухолевыми средствами признана бетулиновая кислота и ее производные [31], одним из естественных источников которых является широко распространенная в России береза повислая (*Betula pendula Roth*). Молекулярный механизм действия тритерпеноидов лупанового ряда и их производных связан со снижением экспрессии гена апоптоза *Bcl-2*, клеточного цикла *Cyclin D1*, каталитической субъединицы теломеразы hTERT. Такие изменения приводят к торможению пролиферации опухолевых клеток и апоптозу [38]. В настоящее время на основе лупановых тритерпеноидов бересты березы осуществлен первый синтез аналогов скваламина (тритерпеноид – производное сквалена), подобных выделенным из печени акул [7].

Активным компонентом корня солодки (*Glycyrrhiza sps.*) является тритерпеноид амиранового ряда – глицирризиновая кислота, которая обладает антиканцерогенным и антимуtagenным действием, а также способна избирательно ингибировать рост опухолевых клеток в культуре [30].

Установлено, что выделенные из корней легендарного лекарственного растения женьшеня глюкозиды тритерпеновой природы – панаксозиды оказывали прямое и опосредованное (через иммунологические реакции организма) ингибирование пролиферации опухолевых клеток [14; 24].

Имеются отдельные сообщения об обнаружении цитотоксической активности в отношении раковых клеток человека при воздействии ланостановых тритерпеноидов [46], выделенных из корней корейской пихты (*Abies koreana*).

Тетратерпеноиды

К этой группе относятся каротиноиды (ретиноиды), содержащиеся в овощах и фруктах и являющиеся предшественниками витамина А.

Ретиноиды, в частности – транс-ретиноевая кислота (АТРА, третиноин), эффективно используются в основном в комбинированной и сопроводительной терапии острого промиелоцитарного лейкоза. Выявлена способность транс-ретиноевой кислоты подавлять рост клона измененных клеток крови и вызывать их дифференцировку. Механизм действия транс-ретиноевой кислоты обусловлен повреждениями, вызванными ее связью с ядерными рецепторами ретиноевой кислоты, принадлежащими к суперсемейству ядерных рецепторов – стероидным и тиреоидным гормонам [27; 40].

Другим вызывающим интерес у исследователей тритерпеноидом является ликопин, который чаще всего содержится в томатах и грибах. Среди каротиноидов ликопин выделяется высокой антиоксидантной, радиопротекторной и антипролиферативной активностью. Есть данные, свидетельствующие о целесообразности приема ликопина для предупреждения рака и процесса метастазирования при опухолях простаты, легких и желудка [41].

Политерпеноиды

Из представителей этой большой группы растительных терпеноидов наибольший интерес представляют полипренолы, близкие по химической структуре долихолам животных и человека.

Основным источником промышленного получения полипренолов являются хвоя хвойных деревьев (сосна, ель, пихта, гинкго). Природные полипренолы, попадая в пищеварительный тракт, метаболизируются в долихолы, тем самым обеспечивается нормальный долихол-фосфатный цикл биосинтеза гликопротеинов и полисахаридов. Структурное сходство долихолов и полипренолов позволяет обосновать возможность их применения для профилактики и лечения различных патологий, в том числе – злокачественных новообразований [11].

Природный терпеноидный комплекс

О комплексном воздействии суммы терпеноидов свидетельствуют эксперименты, проведенные в НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) на различных моделях опухолей, индуцированных химическими канцерогенами у животных [4]. На антиканцерогенную активность исследовались биологически активная добавка к пище «Феакарпин» и ее действующая субстанция «Комплекс хвойный натуральный», полученные из хвои сосны и ели.

Эти препараты в своем составе содержат в основном соединения, по своей химической структуре относящиеся к классу терпеноидов (смоляные кислоты, эфирные масла, полипренолы, каротиноиды, витаминные групп E и K, фитостерины, сквален). Как показали результаты проведенных исследований, субстанция «Комплекс хвойный натуральный» и препарат «Феакарпин» эффективно тормозили развитие опухолей молочной железы, кожи, шейки матки и легких, индуцированных у животных канцерогенами.

По мнению авторов, препарат «Феакарпин» является перспективным для применения в качестве средства, снижающего риск развития онкологических заболеваний. Антиканцерогенные механизмы действия всей группы природных веществ, содержащихся в препарате, авторы объясняют их антимуtagenными, антиоксидантными, иммуностимулирующими свойствами, способностью стимулировать детоксицирующие ферменты, тормозить опухолевый рост, индуцировать апоптоз, ингибировать активность протеаз и медиаторов воспаления.

Результаты собственных исследований также подтверждают, что наиболее выраженной биологиче-

ской активностью, в том числе и противоопухолевой, обладает именно природный комплекс терпеноидов хвойных деревьев. Так, при экспериментально-клиническом изучении разработанного нами лекарственного средства Абисил (для местного и наружного применения), содержащего в своем составе природный набор терпеноидов пихты сибирской, обогащенный монотерпеноидами, был выявлен ряд фармакологически значимых эффектов: антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, регенерирующие, иммуностимулирующие и обезболивающие [15; 16; 22]. Кроме того, у субстанции препарата Абисил в результате экспериментальных исследований с перививаемыми опухолевыми штаммами обнаружена дозозависимая противоопухолевая активность, характеризующаяся не только торможением роста опухолей у животных и удлинением продолжительности их жизни, но и способностью активизировать синтез биорегуляторных веществ, направленных на процесс регрессии опухоли и выживаемости животных опухоленосителей [23].

У пероральной лекарственной формы препарата Абисилин® (Абисил 20 %-ный раствор в масле) выявлена противоопухолевая активность, характеризующаяся торможением роста ряда перививаемых опухолей (меланомы B-16, Ca-755, РШМ-5, LLC), индукцией апоптоза опухолевых клеток (линий Jurkat, Raji, PC-3, U-937), способностью ингибировать процесс рецидивирования и метастазирования CLL, а также проявлением антиангиогенных свойств *in vitro* и *in vivo*. [54].

По всей вероятности, широкий спектр фармакологической активности, в том числе и противоопухолевые эффекты субстанции Абисил и его лекарственных форм для местного, наружного и перорального введения, обусловлены синергетичным действием всего комплекса нетоксических, терпеноидсодержащих веществ (моно-, сескви-, ди- и тритерпеноиды).

Учитывая многокомпонентность препарата, полученного из пихты сибирской, представленную терпеновыми соединениями разных классов, можно предположить его многофункциональное противоопухолевое действие, в том числе – направленное на снижение активности НМГ-СоА-редуктазы, ингибирование фарнезилтрансферазы, подавление синтеза мевалоновой кислоты и других изопреноидов мевалонатного пути биосинтеза в живых клетках.

Есть мнение, что неконтролируемый синтез мевалоновой кислоты в раковых и предраковых клетках – это уникальная и специфическая черта злокачественных опухолевых клеток, связанная с гиперпотребностью в ней [55; 58] при синтезе ДНК (в частности, в S-фазе злокачественного деления). Блокада синтеза мевалоновой кислоты влияет на уровень всех продуктов, образующих из этого предшественника изопреноидов (цитокины, холестерин, сквален, половые гормоны, убихинон и другие).

Как считают некоторые авторы [49; 51], разработка более избирательных ингибиторов изопреноидных соединений может привести к появлению нового класса терапевтических препаратов для лечения заболеваний, характеризующихся активизацией пролиферации клеток, в частности – злокачественных новообразований. Можно предположить, что терпеновые соединения, входящие в состав основных лесообразующих пород деревьев Российской Федерации (сосна, ель, пихта, лиственница) и способные оказывать выраженное противоопухолевое действие, могут оказаться перспективным источником для получения эффективных средств специфического лечения онкологических заболеваний.

Заключение

Таким образом, анализ данных научной литературы и собственных исследований характеризует растительные терпеноиды, особенно – полученные из хвойных пород деревьев, как перспективный класс с точки зрения поиска природных соединений с выраженными противоопухолевыми свойствами.

Широкий спектр противоопухолевой активности, выявленный среди многочисленных групп растительных терпеноидов, каждая из которых имеет свой неповторимый химический состав, открывает перспективные возможности для эффективного использования этих веществ в онкологии.

Литература

1. Адекенов С.М. Синтез и биологическая активность новых производных арглабина и перспективы производства оригинальных фитопрепаратов // Российский биотерапевтический журнал – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 7–14.
2. Акимов Ю.А. Экологическая биохимия летучих терпеноидов высших растений. – Ялта: ГНБС, 1987. – 186 с.
3. Амосова Е.Н., Зуева Е.П., Разина Т.Г. и др. Лекарственные растения как средства дополнительной терапии для лечения опухолей // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2003. – Прил. № 2 – С. 24–34.
4. Беспалов В.Г., Александров В.А., Петров А.С. Антиканцерогенное действие биологически активной добавки к пище «Феокарпин» и его действующей субстанции // Вопр. онкологии. – 2006. – Т. 52, № 2. – С. 169–74.
5. Божок А.А., Семиглазов В.Ф., Клецель А.Е. и др. Таксаны в неадьювантной химиотерапии рака молочной железы // Вопр. онкологии. – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 7–14.
6. Вершинина С.Ф., Потявина Е.В. Применение природных биорегуляторов в онкологии // Вопр. онкологии. – 2003. – Т. 49, № 2 – С. 145–51.
7. Гиниятуллина Г.В. Первый синтез аналогов скваламина на основе лупановых тритерпеноидов // Материалы XI школы–конференции по органической химии, Екатеринбург, 2008. – С. 73–5.
8. Гольдберг Е.Д., Амосова Е.П., Зуева Е.П. и др. Влияние экстрактов из лекарственных растений на развитие метастатического процесса // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2004. – Т. 138, № 9 – С. 324–32.
9. Гольдберг Е.Д., Зуева Е.П. Препараты из растений в комплексной терапии злокачественных новообразований. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 2000. – 129 с.
10. Горбунова В.А., Бесова Н.С. Значение таксанов в лечении рака молочной железы // Вопр. онкологии. – 2004. – Т. 50, № 4. – С. 492–500.
11. Григорьева Н.Я., Моисеенко А.М. Физиологическая активность полиизопреноидов // Хим.-фарм. журн. – 1989. – Т. 23, № 2. – С. 144–55.
12. Кинтя П.К., Фадеев Ю.М., Акимов Ю.А. Терпеноиды растений. – Кишинев: «Штикинцо», 1990. – 151 с.
13. Клочков С.Г., Афанасьев С.В., Бачурин С.О., Зефирова Н.С. Ингибиторы фарнезилтрансферазы и направленная терапия рака // Материалы науч.-практ. конф. (16-17 октября 2006 г., Ростов-на-Дону) – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. – С. 69.
14. Купин В.И., Летягин В.П., Сюткина Н.И. Применение препаратов, полученных из растений семейства аралиевых (элеутерококк, женьшень, сапарол), в онкологии // Вестник ОНЦ РАМН. – 1992. – Т. 2. – С. 12–9.
15. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата «Абисил» // Современные проблемы педиатрии и детской хирургии... Иркутск, 7–8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркут. Ун-та, 1998. – С. 233–8.
16. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Токсичность и переносимость животными препарата «Абисил» при наружном и пероральном применении // Актуальные проблемы клинической медицины: Материалы 11 региональной науч.-практ. конф. молодых ученых. – Иркутск, 1998. – С. 127–8.
17. Макарачук Н.М., Лецинская Я.С., Акимов Ю.А. и др. Фитонциды в медицине. – Киев: Наук. Думка, 1990. – 216 с.
18. Машковский М.Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей. – 15-е изд. перераб., испр., доп. – М.: Новая Волна, 2005. – 1200 с.
19. Пасеиниченко В.А. Биосинтез и биологическая активность растительных терпеноидов и стероидов // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биологическая химия. – 1987. – Т. 25. – С. 1–196.
20. Пасеиниченко В.А. Терпеноиды и стероиды в жизни растений // Успехи биологической химии. – 1991. – Т. 32. – С. 197–220.
21. Пентегова В.А., Дубовенко Ж.В., Ралдугин В.А., Шмидт Э.П. Терпеноиды хвойных растений. – Новосибирск: Наука, 1987. – 97 с.
22. Пинигина Н.М., Лацерус Л.А., Брайн Э.В. и др. Средство «Абисил», обладающее противовоспалительной, антибактериальной и ранозаживляющей активностью // Патент РФ №2054945 от 27.02.1996.
23. Пинигина Н.М., Лацерус Л.А., Лацерус Ф.Э. Эндогенная фармацевтическая композиция, полученная на основе целенаправленной активации гуморальных медиаторов нервных окончаний коры головного мозга. – Патент РФ № 2244928, 2003.
24. Попов А.М., Атопкина Л.Н., Уварова Н.И., Еляков Г.Б. Антиметастатическая и иммуномодулирующая активности минорных гликозидов женьшеня // Докл. АН. – 2001. – Т. 280, № 1. – С. 113–6.
25. Рахимов К.Д. Фармакологическое и доклиническое изучение нового противоопухолевого препарата арглабин // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2 – С. 15–7.
26. Ремизова О.В., Жигунова Л.Н., Жигунов Д.И. и др. Способ получения R-тетраола, обладающего противоопухолевой активностью. – Патент РФ № 2196581, 2000.

При разработке противоопухолевых препаратов и изучении возможности их включения в химиотерапевтические схемы лечения пациентов с онкологическими заболеваниями следует учитывать, что многокомпонентность состава терпеноидов лекарственных растений обуславливает способность воздействовать на ключевые молекулярные процессы, препятствующие прогрессированию трансформации нормальных клеток в опухолевые.

Относительно низкая токсичность терпеноидов растительного происхождения и многонаправленность их фармакологического воздействия являются важными преимуществами этих соединений при использовании в профилактике и лечении злокачественных новообразований.

27. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. Н.И. Переводчиковой. – 2-е изд., доп. – М.: Практическая медицина, 2005. – 704 с.
28. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений. – Новосибирск: Наука, СИФ РАН, 2000. – 664 с.
29. Стрелкова М.А., Кириллова Н.В. Противоопухолевая активность извлечений, полученных из биомассы культивируемых клеток *Taxus baccata* L. // Раст. ресурсы. – 2002. – Вып.3. – С. 70–5.
30. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. Глицирризиновая кислота // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 23, № 9. – С. 691–709.
31. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А. и др. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы: I. Природные производные лупана // Биоорганическая химия. – 2006. – Т. 32, № 1. – С. 42–55.
32. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая медицина, 2005. – 272 с.
33. Фуксман И.Л. Биологические реакции *Pinus silvestris* L. на действие стрессовых факторов // Раст. ресурсы. – 2002. – Т. 38, Вып. 2. – С. 126–31.
34. Чочиева А.Р. Ингибирующий эффект лимонена в отношении развития опухолей молочной железы, индуцированных N-метил-N-нитрозомочевинной у крыс // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 6. – С. 80–1.
35. Шабанова Н.Ю., Ведерников Д.Н., Роцин В.И. Сесквитерпены березы *Betula pendula* Rath // Раст. ресурсы. – 2003. – Т. 39, Вып. 3. – С. 106–10.
36. Шайкенов Т.Е., Бейкер Ф.Л., Вульфбартер Л., Адекенов С.М. Влияние арглабина на индукцию апоптоза опухолевых клеток и ингибирование фарнизилтрансферазы как возможный механизм действия // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 18–23.
37. Шеллер А. Арглабин в лечении диссеминированных процессов // РБЖ. – 2005. – Т. 5, № 2. – С. 62–3.
38. Шиняткина А.Б., Борисов В.И., Шульц Э.Э. Исследование противоопухолевого механизма действия бетулиновой кислоты и ее производных *in vitro* // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Прил. №1. – С. 138–9.
39. Bonnetterre J., Spielman M., Guastalla J.P. et al. Efficacy and safety of docetaxel in heavily pretreated advanced breast cancer patients the French Compassionate USE Programme Experience//Europ. J. Cancer. – 1999. – 35(10). – P. 1431–9.
40. Fenaux P., Chastang C., Chevret K. et al. A randomized comparison of all trans-retinoic acid... // Blood. – 1999. – 94. – P. 1192–200.
41. Grester H. The potential role of lycopene for human health // J. Am. College of Nutrition. – 1997. – 16(2). – P. 109–26.
42. Cernesechi S., Schneider Y., Ceralint J. et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyaminebiosynthesis in human color cancer cells // J. Pharmacol. and Exp. Ther. – 2001. – 298(1). – P. 197–200.
43. Crowell P., Chang R., Ren Z. et al. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26 kDa proteins by the anticancerogen d-limonen and its metabolites // J. Biol. Chem. – 1991. – 266. – P. 1779–85.
44. Haag J.D., Lindstrom M.J., Gould M.N. Limonen-induced regression of mammary carcinomas // Cancer Res. – 1992. – Vol. 52. – P. 4021–6.
45. Holmes F.A., Walterrs R.S., Theriault R.L. et al. Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer // J. Natl. Cancer Inst. – 1991. – 83. – P. 1797–805.
46. Kim Hyun Jung, Choi Eun Hwa, Lee Ik-Soo. Two lanostane triterpenoid from *Abies koreana* // Phytochemistry. – 2004. – 65(18). – P. 2545–9.
47. Liby K.T., Yore M.M., Sporn M.B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer // Nature Rev. Cancer. – 2007. – 7. – P. 357–69.
48. Long B., Kazboni G., Wasserman A. et al. Eleuthrobin, a novel cytotoxic that induced tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol R) // Cancer Research. – 1998. – 58(6). – P. 1111–5.
49. Mass Z., Keane W., Kasiske B. Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond holesterol reduction ? // Lancet. – 1996. – 347. – P. 102–3.
50. Miquel K., Pradines A., Favre G. Farnesol and geranilgeraniol induced actin cytoskeleton disorganization and apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1996. – 225(3). – P. 869–76.
51. Mo H., Elson C.E. Studies isopreoid – mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer // Exp. Biol. Med (Maywood). – 2004. – 229(7). – P. 567–85.
52. Nabholtz J.M., Senn H.J., Bezwoda W.R. et al. Prosrective randomized trial of docetaxel versus mitomycin C plus vinblastin in patients with metastatic breast cancer progressing despite previos anthracycline-containing chemotherapy // J. Clin. Oncol. – 1999. – 17. – P. 1413–24.
53. Picman A.K. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones // Biol. Syst. Ecol. – 1986. – 14(3). – P. 225–81.
54. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov A.U. et al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition “Abisilin” exhibiring angiogenesis-inhibitig action.
55. Quesney-Huneus V., Galick H.A., Siperstein M.D. et al. The dual role of mevalonate in the cell cycle // Biol. Chem. – 1983. – 258. – P. 378–85.
56. Sendman A.D., Reicman B.S., Crown J.P. et al. Paclitaxel as second and subsequent therapy for metastatic breast cancer. Activity independent of prior anthracieline response // J. Clin. Oncol. – 1995. – 13. – P. 1152–9.
57. Setzer W.N., Setzer M.S. Plant – derived triterpenoids as potential antineoplastic agents // Mini Rev. Med. Chem. – 2003. – 3. – P. 540–58.
58. Swanson R.M., Hohl R.J. Anticancer therapy: targeting the mevalonate pathway // Curr. Cancer Drug Targets. – 2006. – 6. – P. 15–37.
59. Yasukawa K., Takido M., Matsumoto T. et al. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis // Oncology. – 1991. – 48. – P. 72–6.
60. Zhu K., Hamilton A.D., Sebti S.M. Farnesiltransferase inhibitors as anticancer agents: current status // Curr. Opin Investig Drugs. – Tampa, 2003. – P. 1428–39.
61. Zhu Jun, Beattie Eris C., Yang Yang et al. Centrosome impairment and consequent cytokinesis defects are possible mechanisms of taxane drugs // Anticancer Res. – 2005. – 25(3B). – P. 1919–25.

УДК 615.322.015.44:616-091.818

Л.А. Лацерус¹, Н.М. Пинигина², А.Ю. Барышников², М.В. Огородникова²**ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация**

Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: initium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Абисилин® – отечественный пероральный препарат, содержащий в своем составе природный комплекс терпеноидов, синтезируемый хвойными деревьями. В экспериментах *in vitro* установлено, что препарат Абисилин® может оказывать избирательное цитотоксическое действие на опухолевые клетки и вызывать их гибель по типу апоптоза.

Ключевые слова: Абисилин®, опухолевые клетки, цитотоксическая активность, апоптоз.

L.A. Latseruz¹, N.M. Pinigina¹, A.Yu. Baryshnikov², M.V. Ogorodnikova²**THE CYTOTOXIC APOPTOSIS-INDUCING ACTIVITY OF ABISILIN**¹Initium-Pharm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

In this review we discuss the anticancer activity of different groups of terpenoids obtained from coniferous trees, particularly from *Pinaceae*.

Key words: medicinal plants, terpenoids, anticancer activity.

Введение

Одним из направлений по изысканию новых лекарственных средств для использования в онкологии является поиск специфически активных природных соединений растительного происхождения, обладающих слабой токсичностью в отношении нормальных клеток.

Особый интерес вызывают растительные терпеноиды, в том числе полученные из хвойных деревьев, среди которых выявлены соединения, проявляющие противоопухолевую активность [4; 5; 7]. Большой набор моно-, сескви-, ди- и тритерпеноидов, обнаруженных в хвойных породах деревьев, может оказаться перспективным источником получения эффективных средств для лечения больных онкологическими заболеваниями [3].

Лекарственный препарат Абисилин® (Абисил 20 %-ный раствор в масле для перорального применения) содержит в своем составе природный комплекс терпеноидов (изопреноидов), синтезируемый хвойными деревьями [9].

Для субстанции препарата (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственной формы для местного и наружного применения, включенных в Государственный реестр лекарственных средств, выявлены антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие и другие фармакологически значимые эффекты [1; 2].

Принимая во внимание низкую токсичность препарата Абисилин, а также его способность оказывать разнонаправленное действие на биологические процессы в организме, возникает необходимость в изучении его противоопухолевой активности.

Цель настоящей работы – определение *in vitro* цитотоксической и апоптозиндуцирующей активности препарата Абисилин в отношении некоторых клеточных линий опухолей человека.

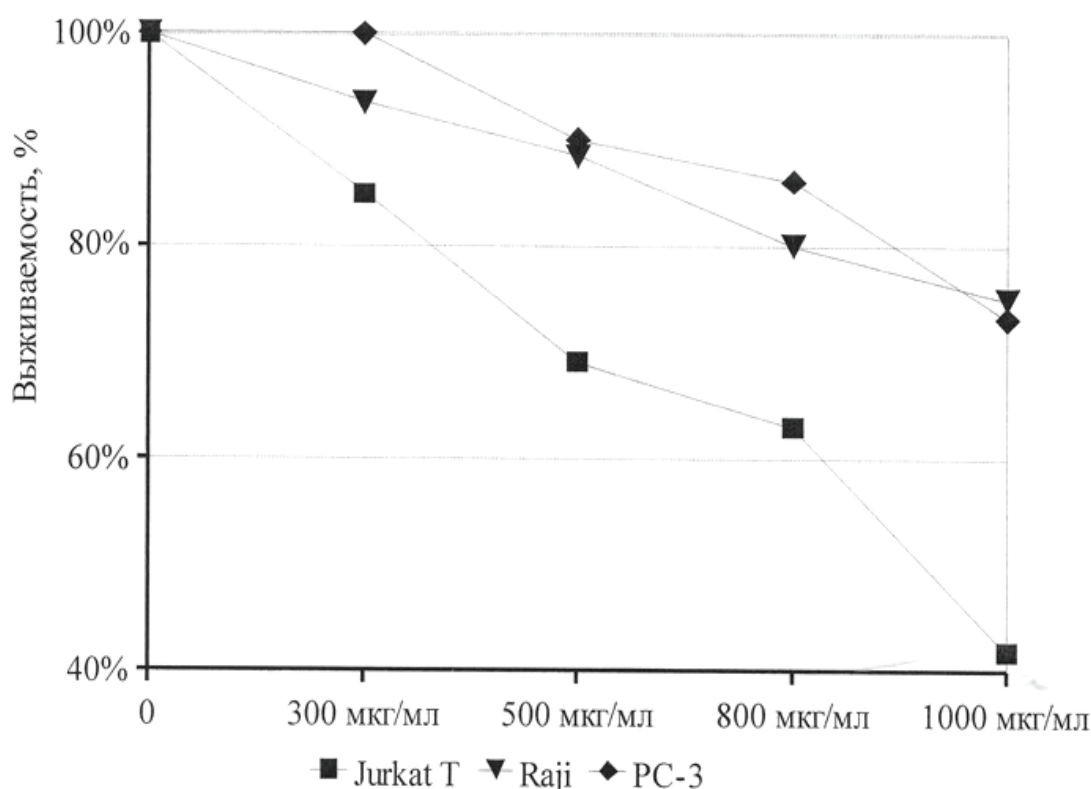
Материалы и методы

Исследования проводили на опухолевых клеточных линиях: Т-клеточный лимфобластный лейкоз – Jurkat, В-клеточный лейкоз – Raji, хронический миелогенный лейкоз – K562, миелолейкоз – U937, меланома – Mel P, рак молочной железы – T 47 D, рак яичников – SKOV-3, рак предстательной железы – PC-3.

Клеточные линии выращивали в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ/мл глутамина, 0,1 мг/мл гентамицина, витамины, пируват натрия, аминокислоты при 37 °С и в атмосфере 5% CO₂.

Для исследования использовали следующие концентрации препарата Абисилин®: 300 мкг/мл, 500 мкг/мл, 800 мкг/мл, 1000 мкг/мл. При разведении препарата применяли 1 %-ный раствор ДМСО, приготовленный с использованием PBS.

Определение цитотоксической активности Абисилина® проводили колометрическим методом с использованием МТТ-теста [6; 8]. Опухолевые клетки в концентрации 5×10⁴ клеток/мл засеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Sarstedt), добавляли по 20 мкл препарата в исследуемых концентрациях и инкубировали 72 ч в стандартных условиях (каждую концентрацию препарата исследовали в триплетах). В качестве контролей использовали триплет лунок без препарата и триплет лунок с добавлением 20 мкл 1% ДМСО.



Выживаемость опухолевых клеток при инкубации с Абисилином.

За 5 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, Chemical Co, США). После окончания инкубации клетки осаждали центрифугированием планшетов при 1000 об/мин в течение 2–3 мин.

Супернатант аккуратно отбирали и в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО (ICN Bio-medicals, Inc) – растворителя кристаллов формазана. Клетки ресуспендировали и инкубировали 10 мин при 37 °С, после чего измеряли оптическую плотность раствора на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-01 (Россия) при ν 540 нм.

МТТ метаболизируется жизнеспособными клетками, превращаясь в нерастворимый в воде формазан, тем самым, изменяя оптическую плотность раствора пропорционально количеству выживших клеток. Опухолевые клетки считали чувствительными к исследуемому препарату, если количество погибших клеток в культуре составляло не менее 50 %.

Каждый эксперимент повторяли 3 раза. Процент выживаемости определяли по формуле (среднее значение ОП в опыте / среднее значение ОП в контроле) \times 100 %. Выявление апоптических клеток проводилось методом двойного прижизненного окрашивания с использованием Аннексина V- FITC в комбинации с таким витальным красителем, как пропедиум иодид (PI).

Окрашенные по Аннексину V-FITC и PI клетки оценивали по следующим критериям: живые клетки отрицательные по Аннексину V и PI ($AnV^- PI^-$), ранние апоптические клетки положительные по Аннексину V и отрицательные по PI ($AnV^+ PI^-$), поздние апоптические или некротические клетки положительные по Аннексину V и по PI ($AnV^+ PI^+$).

В качестве контроля использовали опухолевые клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но в

отсутствии препарата, а также опухолевые клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но вместо препарата добавляли 1%-ный раствор ДМСО.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. При сопоставлении средних величин использовали критерий значимости Стьюдента (различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При инкубации опухолевых клеток с препаратом Абисилин® его цитотоксическое действие выявлено только в отношении клеточных линий Jurkat, Raji и PC-3. Кривые выживаемости опухолевых клеток под воздействием препарата представлены на рисунке.

Наиболее выраженное цитотоксическое действие препарат Абисилин® проявил по отношению к клеточной линии Jurkat – 41,8 % при использовании препарата в концентрации 1000 мг/мл. С увеличением концентрации Абисилина® уменьшался процент живых опухолевых клеток и наоборот.

При исследовании препарата Абисилин® в отношении опухолевых клеток U937, K562, T 47 D, SKOV-3, Mel P цитотоксического эффекта выявлено не было.

Определение апоптоза, индуцированного действием препарата Абисилин® с использованием метода прижизненного двойного окрашивания Annexin V/PI, было проведено на опухолевых клетках линий Jurkat, Raji, PC-3, U937 в концентрации препарата 300 мкг и 1000 мкг.

Установлено, что Абисилин® вызывал гибель опухолевых клеток исследованных линий по типу апоптоза (см. таблицу).

Таблица

Результаты исследования абисилин-индуцированного апоптоза

Препарат	Суммарное кол-во опухолевых клеток положительных по AnV+PI ⁻ , AnV+PI ⁺ , AnV ⁻ PI ⁺ , %			
	Jurkat	Raji	PC-3	U937
Контроль (1 %-ный р-р ДМСО)	26,0	23,1	33,1	1,7
Абисилин®, 300 мкг/мл	53,3*	27,9	56,7*	7,4
Абисилин®, 1000 мкг/мл	86,6*	44,9*	62,4*	38,2*

*p<0,05 – достоверность различия между опытом и контролем

С опытным увеличением концентрации Абисилина® число клеток, достигших апоптоза, значительно увеличивалось.

Наибольшее количество клеток в сумме положительных по AnV⁺PI⁻, AnV⁺PI⁺, AnV⁻PI⁺ было выявлено по отношению к клеточной линии Jurkat и составило 86,6 % при использовании дозы Абисилина® 1000 мкг/мл. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности препарата Абисилин® оказывать избирательное цитотоксическое действие на опухолевые клетки и вызывать их гибель по типу апоптоза.

вилось 86,6 % при использовании дозы Абисилина® 1000 мкг/мл. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности препарата Абисилин® оказывать избирательное цитотоксическое действие на опухолевые клетки и вызывать их гибель по типу апоптоза.

Выводы

1. Лекарственный препарат Абисилин® обладает избирательной цитотоксической активностью в отношении некоторых клеточных линий опухолевых клеток (Jurkat, Raji, PC-3).
2. Выживаемость опухолевых клеток зависит от концентрации препарата Абисилин®. При увеличении концентрации препарата уменьшается процент живых опухолевых клеток.
3. Препарат Абисилин® вызывает гибель опухолевых клеток по типу апоптоза.

Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 2004. – Т. 1. – С. 93.
2. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата «Абисил-1» // Современные проблемы педиатрии и детской хирургии: Материалы Сибирско-Американской научно-практической конференции. 7–8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1998. – С. 233–8.
3. Пентегова В.А., Дубовенко Ж.В., Ралдугин В.А., Шмидт Э.П. Терпеноиды хвойных растений. – Новосибирск: Наука, 1987. – 97 с.
4. Рахимов К.Д. Фармакологическое и доклиническое изучение противоопухолевого препарата арглабин // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 15–7.
5. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А. и др. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы: 1. Природные производные лупана // Биологическая химия. – 2006. – Т. 32, № 1. – С. 42–55.
6. Boyd M. Status the NCI. Preclinical antitumor drug discovery screen // Principles and practice of oncology. – 1989. – 3(10). – P. 1–12.
7. Kim Hyun Jung, Choi Eun Hwa, Lee Ik-Soo. Two lanostane triterpenoid from Abies koreana // Phytochemistry. – 2004. – 65(18). – P. 2545–9.
8. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. of Immunological methods. – 1983. – 65. – P. 55–63.
9. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et. al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition “Abisilin” exhibiting angiogenesis-inhibiting action.

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).

(продолжение см. на стр. 24)

УДК 615.322.015.44:611.018.74

Л.А. Лацерус¹, Н.М. Пинигина¹, А.Ю. Барышников², Е.В. Степанова²**АНТИАНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® *IN VITRO* И *IN VIVO***¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация**

Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: inidium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 24.11.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Абисилин® – отечественный пероральный препарат, содержащий в своем составе природный комплекс терпеноидов, синтезируемый хвойными деревьями. Проведены исследования по оценке антиангиогенных свойств препарата с использованием цитотоксического, пролиферационного и миграционного тестов, а также метода ингибирования формирования сосудистоподобных структур. В опытах *in vitro* показано, что Абисилин® вызывает гибель ($LD_{50}=0,21$ мг/мл) и блокирует пролиферацию ($IK_{50}=0,09$ мг/мл) эндотелиальных клеток SVEC-4-10. Препарат концентрации 0,25 мг/мл блокирует на 89 % миграцию эндотелиальных клеток и тормозит в концентрации 0,125 мг/мл образование трубочкоподобных структур. Установлено, что препарат Абисилин® при введении мышам $C_{57}BL/6$ перорально в течение 7 дней в дозах 2; 1 и 0,2 мг/мл блокирует рост новых сосудов в имплантате Матригеля с введенным стимулятором ангиогенеза bFGF. Полученные данные свидетельствуют о способности препарата Абисилин® блокировать основные этапы опухолевого ангиогенеза.

Ключевые слова: Абисилин®, антиангиогенные свойства, эндотелиальные клетки.L.A. Latserus¹, N.M. Pinigina¹, A.Yu. Baryshnikov², E.V. Stepanova²**ANTIANGIOGENIC ACTIVITY OF ABISILIN® *IN VITRO* AND *IN VIVO***¹Inidium-Parm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

In this study we have examined the cytotoxic, antiproliferative and migrative activity of Russian anticancer drug – Abisilin® – which is known to be the complex of terpenoids. Here we show that Abisilin® induced the cell death ($LD_{50}=0,21$ mg/ml) and inhibited endothelial SVEC 4-10 cells proliferation ($IK=0,09$ mg/ml). The migration of cells was inhibited for about 89 % at the concentration 0,25 mg/ml. In this study we have also studied the effect of Abisilin® on capillary-like structures formation by SVEC 4-10 cells. Abisilin® blocked the formation of such structures. *In vivo* experiments demonstrated that Abisilin® at doses 2; 1 et 0,2 mg/kg body weigh reduced the microvascular density of vessels when administrated per os.

Key words: Abisilin®, antiangiogenic capacity, endothelial cells.**Введение**

Лекарственный препарат Абисилин® (Абисил 20%-ный раствор в масле для перорального применения) содержит в своем составе природный комплекс терпеноидов (изопреноидов), синтезируемый хвойными деревьями.

Субстанция препарата (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственная форма для местного и наружного применения, включенные в Государственный реестр лекарственных средств, проявляют антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие и другие фармакологически значимые эффекты [1–3].

Широкий спектр фармакологической активности препарата, по-видимому, связан с многокомпонентным набором терпеноидов, входящих в его состав. Известно, что среди природных соединений этого класса найдены вещества с выраженными противоопухолевыми свойствами.

Например: таксаны, каротиноиды, токоферолы и другие [4].

Цель работы – изучение антиангиогенной активности препарата Абисилин® *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

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

Для исследования использовали препарат Абисилин® для перорального применения. Раствор препарата готовился в стоковой концентрации 10 мг/мл (10% ДМСО/PBS) в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДитО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в день постановки экспериментов. Препарат – взвесь белого цвета – разводили в 1% PBS. Все эксперименты были повторены не менее 4 раз [5].

Анализ цитотоксического действия на культуру эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10

Клетки (6×10^4 в мл) сажали на 96-луночный планшет в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин. Спустя 24 ч добавляли препарат в различных концентрациях. Инкубацию с препаратом проводили 1 день, затем добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали 4 ч, затем среду отбрасывали и клетки растворяли в ДМСО.

Оптическую плотность оценивали на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» при 540 нм, используя DMSO как нулевой контроль.

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

Клетки (3×10^5 в мл) сажают на 24-луночный планшет в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин, и инкубируют до образования монослоя. Затем монослой нарушают путем соскабливания части клеток. В течение 24 ч клетки инкубируют в среде DMEM, содержащей 10% FCS, 2мМ глутамин и нецитотоксические дозы препарата.

В качестве положительного контроля используют клетки, инкубированные в DMEM без добавления сыворотки.

Результаты оценивают как процент мигрирующих клеток в опыте по отношению к контролю (клетки в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин).

Ингибирование образования трубчочкоподобных структур эндотелиальными клетками SVEC-4-10

24-луночную плашку покрывают раствором Матригеля (250 мкл/лунка) и инкубируют 20 мин при 37 °С до его полимеризации. Клетки (4×10^5 в мл) инкубируют в среде DMEM с добавлением нецитотоксических доз препарата в течение 30 мин при 37 °С.

Затем клетки (500 мкл) наносят в лунки, покрытые Матригелем, и инкубируют в CO₂-инкубаторе в течение 4–5 ч. В качестве положительного контроля используют клетки, инкубированные в среде DMEM без добавления препарата. Оценивают длину трубочек и количество контактов между трубочками.

Модель имплантата Матригеля *in vivo*

В экспериментах использовали мышей-самок C57Bl/6 возрастом 6–8 нед. Матригель (BD Bioscience, Discovery Labware) при 4 °С смешивали только со 100 нг/мл bFGF (Becton Dickinson Labware). Смесь Матригеля затем вводили подкожно мышам в подмышечную впадину, где он полимеризовался с формированием имплантата.

Имплантант удалялся на 7-й день, фиксировался в 10 %-ном нейтральном формалине в течение 24–36 ч и заключался в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм докрашивались гематоксилин-эозином. Препарат Абисилин® вводился мышам перорально ежедневно в течение 7 дней в дозе 2; 1 и 0,2 мг/мл.

Результаты

Цитотоксическое действие Абисилина®

Был проведен анализ цитотоксического действия Абисилина® на эндотелиальные клетки при инкубации в течение 24 ч с клетками линии SVEC4-10, высаженными в высокой плотности.

По нашим данным Абисилин® вызывает гибель эндотелиальных клеток в диапазоне концентраций от 1 мг/мл до 0,125 мг/мл (рис. 1). ЛД₅₀ составила 0,21 мг/мл.

Был проведен анализ влияния Абисилина® на пролиферативную активность активированных bFGF эндотелиальных клеток SVEC4-10, высаженных в низкой плотности.

Показано, что Абисилин® блокирует пролиферацию эндотелиальных клеток SVEC4-10 в диапазоне концентраций от 1 мг/мл до 0,125 мг/мл (ИК₅₀=0,09 мг/мл).

В двух нецитотоксических концентрациях (0,0625 мг/мл и 0,031 мг/мл) наблюдалось блокирование пролиферации эндотелиальных клеток на 20 % (рис. 2).

Антимиграционное действие Абисилина®

Способность Абисилина® блокировать миграцию эндотелиальных клеток «в рану» была оценена на диапазоне доз препарата от 0,25 мг/мл до 0,031 мг/мл (рис. 3–4).

Наблюдается блокирование миграции эндотелиальных клеток на 89 % при концентрации Абисилина® 0,25 мг/мл.

Абисилин® не блокирует миграцию эндотелиальных клеток «в рану» в нецитотоксических концентрациях (0,0625 мг/мл и 0,031 мг/мл).

Действие Абисилина® на трубчочкоподобные структуры

Способность Абисилина® блокировать образование трубчочкоподобных структур была оценена в диапазоне доз препарата от 0,125 мг/мл до 0,015 мг/мл.

Исследование показало, что Абисилин® частично блокирует образование трубчочкоподобных структур в концентрации 0,125 мг/мл.

Наблюдаемые трубочки являются короткими, незамкнутыми и не ограничены контактами с другими трубочками. При концентрации Абисилина® 0,0625; 0,031 и 0,015 мг/мл блокирования образования трубчочкоподобных структур не наблюдалось (рис. 5).

Действие Абисилина® на ангиогенез в имплантате Матригеля

Исследование антиангиогенного действия Абисилина® *in vivo* проводилось по способности ингибировать ангиогенез в имплантате Матригеля со стимулятором ангиогенеза bFGF. Абисилин® вводился перорально каждый день в течение 7 дней в концентрациях 0,2; 1 и 2 мг/мл.

Исследование показало, что Абисилин® в изученных концентрациях дозозависимо блокирует образование сосудов в Матригеле (рис. 6).

Максимальное блокирование наблюдалось при концентрациях Абисилина® 1 и 2 мг/мл, при концентрации 0,2 мг/мл – частичное блокирование образования новых сосудов в имплантате Матригеля. На гистологических срезах имплантата Матригеля, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечено дозозависимое снижение количества эндотелиальных клеток и стромальных элементов при кормлении мышей Абисилином®.

Заключение

Проведенное исследование показало, что лекарственный препарат Абисилин® обладает антиангиогенными свойствами в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Полученные данные позволяют рекомендовать его для клинических испытаний в качестве препарата, способного блокировать ангиогенез злокачественных опухолей.

Иллюстрации 4–6 см. на стр. I–II

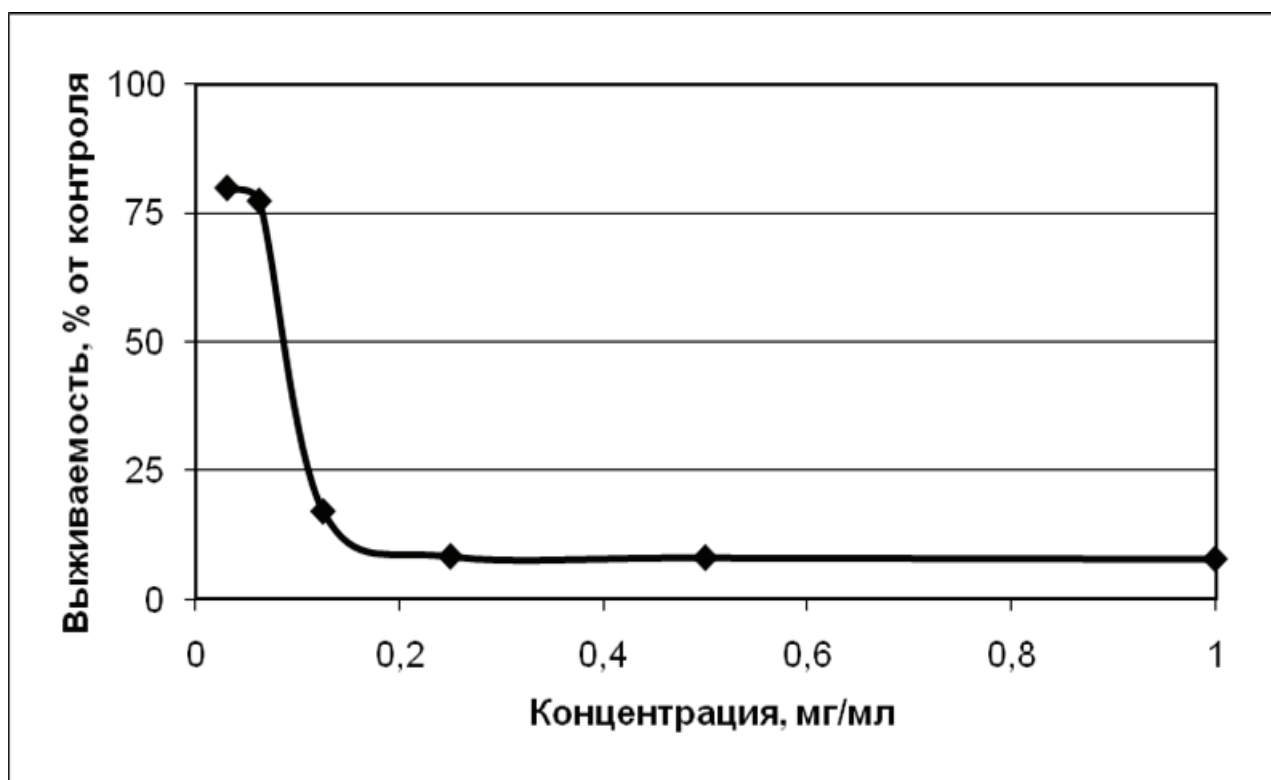


Рис. 1. Цитотоксическое действие Абисилина® на культуру эндотелиальных клеток (SVEC-4-10).

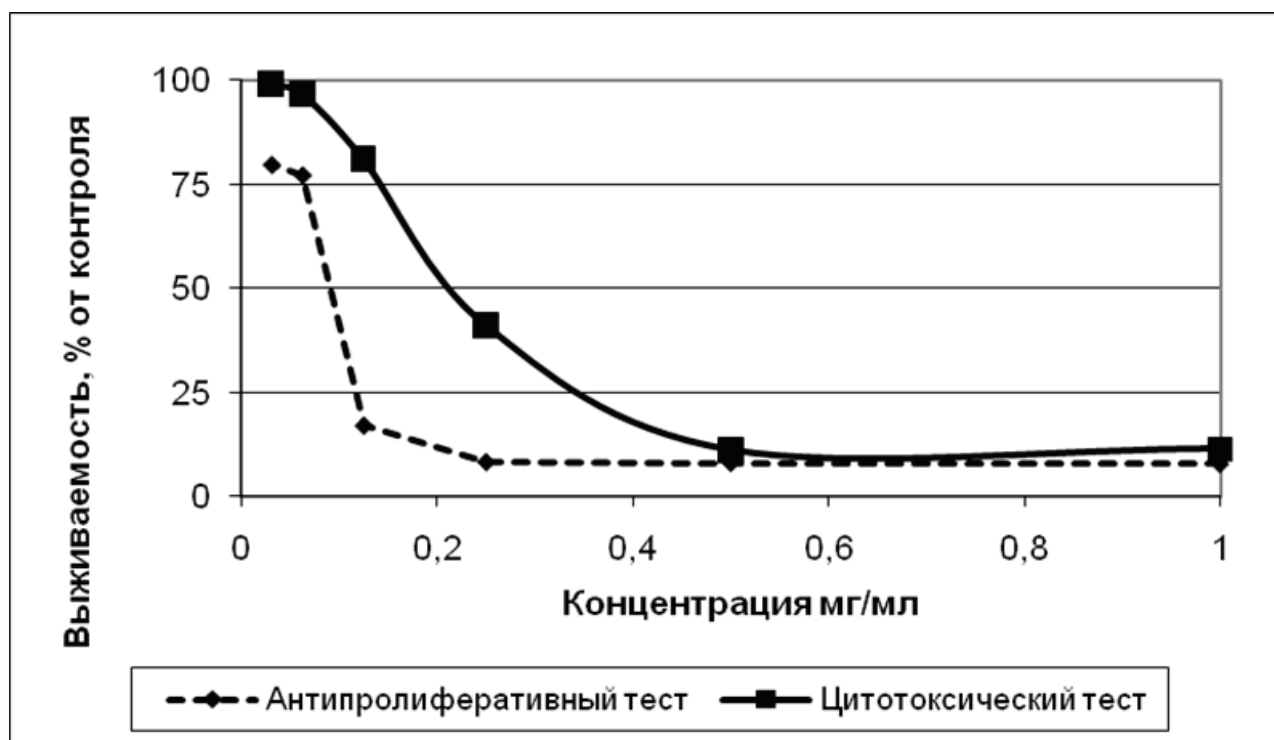


Рис. 2. Антипролиферативное действие Абисилина® на культуру эндотелиальных клеток SVEC-4-10.

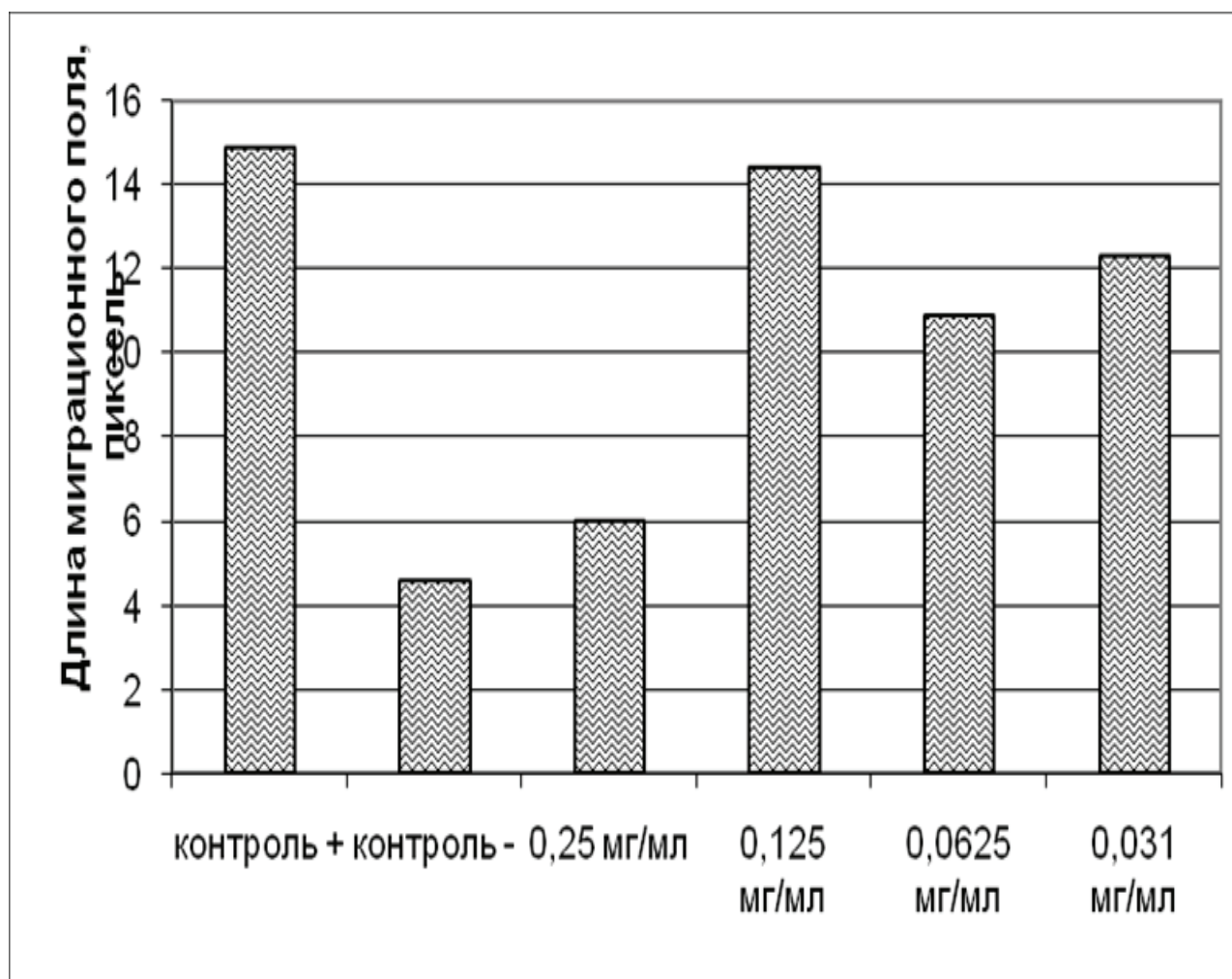


Рис. 3. Влияние Абисилина® на миграцию эндотелиальных клеток SVEC-4-10 в тесте «заживление раны».

Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 2004. – Т. 1. – С. 93.
2. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата «Абисил-1» // Современные проблемы педиатрии и детской хирургии: Материалы Сибирско-Американской научно-практической конференции. Иркутск, 7-8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1998. – С. 233–8.
3. Пинигина Н.М., Лацерус Л.А., Брайн Э.В. и др. Средство «Абисил-1», обладающее противовоспалительной, антибактериальной и ранозаживляющей активностью. Патент РФ №2054945 от 27.02.1996.
4. Трецалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая медицина, 2005. – 272 с.
5. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et. al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition "Abisilin" exhibiting angiogenesis-inhibiting action.

УДК 615.277.3:616-006.-092.4

*Л.А. Лацерус¹, Н.М. Пинигина¹, З.С. Смирнова², А.Ю. Барышников²***ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН®**¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация***Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»***адрес:** 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, **тел.:** +7(499)-722-2357**e-mail:** inidium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Работа посвящена изучению противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях мышей и крыс препарата Абисилин®, содержащего в своем составе природный комплекс терпеноидов, синтезируемый хвойными деревьями. Выявлена противоопухолевая активность препарата Абисилин® в отношении меланомы В-16, аденокарциномы молочной железы Са-755, эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC), рака шейки матки (РШМ-5) и саркомы М-1 крыс. Установлена терапевтическая доза препарата Абисилин равная 100 мг/кг при ежедневном пероральном введении животным с перевиваемыми опухолями. Не выявлено токсических проявлений препарата Абисилин®.

Ключевые слова: Абисилин®, перевиваемые опухоли, противоопухолевая активность.*L.A. Latseruz¹, N.M. Pinigina¹, Z.S. Smirnova², A.Yu. Baryshnikov²***ANTICANCER ACTIVITY OF ABISILIN®**¹Inidium-Parm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

We have studied the anticancer activity of Abisilin® *in vivo* animal models. Abisilin® is a complex of terpenoids synthesized in coniferous trees. The data reveal that Abisilin® possessed the anticancer activity in the treatment of melanoma B-16, Lewes lung carcinoma, carcinoma of uterine cervix, mammary gland adenocarcinoma and sarcoma M-1. The effective therapeutic dose of Abisilin® was 100 mg/kg of body weigh when administrated per os. The toxic side-effects was not observed.

Key words: Abisilin, transplantable tumors, anticancer activity.**Введение**

В настоящее время одним из перспективных направлений в онкологии является поиск природных средств растительного происхождения, эффективных при лечении злокачественных новообразований.

Возрастает интерес к исследованию противоопухолевой активности наиболее распространенных в природе веществ, относящихся к классу терпеноидов. Противоопухолевые свойства выявлены у таких известных соединений терпеноидной структуры и их производных, как например, таксаны, каротиноиды, витамины А и Е, бетулиновая кислота, лимонен и другие [5; 6].

Одним из основных источников получения различных групп растительных терпеноидов являются хвойные породы деревьев (сосна, ель, пихта, лиственница), которые по их количественному содержанию и качественному составу многократно превосходят все другие виды, широко распространенные в мире растений [4].

На основе природного комплекса терпеноидов хвойных деревьев разработана лекарственная форма Абисилина® для перорального применения [8]. У субстанции Абисилина® (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственной формы для местного и наружного применения, включенных в Государственный реестр лекарственных средств, выявлены антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие и другие

фармакологически значимые эффекты [1; 2]. Предполагается, что большой набор моно-, сескви-, ди- и тритерпеноидов, содержащихся в препарате Абисилин® и обеспечивающий многофункциональное фармакологическое действие, может также оказывать эффективное терапевтическое действие при онкологических заболеваниях.

Целью настоящего исследования являлось изучение противоопухолевой активности Абисилина® на перевиваемых опухолях мышей и крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на мышах-гибридах первого поколения BDF₁ (C₅₇ В1/6 × DBA/2) и F₁ (C₅₇ В1/6 × СВА), мышах чистых линий СВА, BALB/с, DBA/2 самках и самцах массой 20–25 г, а также на самках беспородных крыс массой 200–250 г. Мышей и крыс получали из отдела лабораторных животных РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и содержали на обычном рационе питания.

Противоопухолевое действие Абисилина® изучали на широком спектре перевиваемых опухолей мышей: меланоме В-16, эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC), аденокарциномы молочной железы Са-755, раке шейки матки РШМ-5, аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ, асцитной форме опухоли Эрлиха и лимфоцитарной лейкемии Р-388, а также полиморфноклеточной саркомы М-1 крыс [3; 7].

Лекарственная форма Абисилина® представляет собой 20 %-ный масляный раствор для перорального применения.

Абисилин® вводили в дозах 10; 50; 100; 150; 300; 500 мг/кг ежедневно перорально в течение 10 дней, а также двукратно в дозе 2500 мг/кг с интервалом 96 или 216 ч (на 2-й и 6-й дни или 2-й и 11-й дни опыта). В качестве растворителя использовали подсолнечное масло.

Для перевивки солидных опухолей мышей (Ca-755, АКАТОЛ, меланома В-16, LLC, РШМ-5) опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10, и 0,5 мл полученной суспензии, что составляет приблизительно 50 мг опухолевой массы, вводили подкожно в область правой подмышечной впадины мышам, а для перевивки саркомы М-1 крыс добавляли среду 199 до соотношения 1 : 5. Тогда как асцитные опухоли (Р-388 и опухоль Эрлиха) перевивали внутрибрюшинно асцитной жидкостью разведенной средой 199 по 0,3 мл, содержащей 10^6 опухолевых клеток

Лечение начинали через 48 ч после перевивки солидных опухолей и через 24 ч после перевивки лимфолейкоза Р-388 и асцитной формы опухоли Эрлиха. Группы формировались с учетом получения статистически достоверных результатов: контрольная группа состояла не менее чем из 10, опытная группа – 6–8 животных.

Критериями оценки противоопухолевой активности служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) подопытных животных по сравнению с контрольными [3; 7].

ТРО вычисляется по формуле:

$$TPO(\%) = \frac{(V_k - V_o)}{V_k \times 100}, \text{ где}$$

V_k – средний объем опухолей в контрольной группе (мм^3),
 V_o – средний объем опухолей в опытной группе (мм^3).

УПЖ вычисляется по формуле:

$$UPJ(\%) = \frac{(СПЖ_o - СПЖ_k)}{СПЖ_k \times 100}, \text{ где}$$

СПЖ_к – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни),

СПЖ_о – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Минимальные критерии активности – торможение роста опухоли ≥ 50 %, увеличение продолжительности жизни ≥ 25 %. Токсичность Абисилина® оценивалась по ранней гибели опытных мышей по сравнению с гибелью контрольных животных и состоянию внутренних органов животных (селезенка, легкие, наличие метастазов в легких), изменению массы тела по сравнению с исходной.

Статистическая значимость противоопухолевого эффекта Абисилина® по отношению к животным группы контроля (нелеченным) определялась по методу Фишера–Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что на меланоме В-16 Абисилин® про-

являл кратковременный умеренный статистически значимый противоопухолевый эффект только в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг при его введении в течение 10 дней – ТРО составило 66 % (на 13 день опыта) и 63 % (на 7 день опыта) соответственно, а также в дозе 2500 мг/кг при двукратном введении с интервалом 96 ч (ТРО=62 %) на 7-й день опыта (табл. 1). В тоже время Абисилин был неэффективен в дозах 50; 300 и 500 мг/кг при ежедневном введении в течение 10 дней и в дозе 2500 мг/кг при двукратном введении с интервалом в 216 ч. При применении Абисилина® в суммарной дозе 5000 мг/кг токсических проявлений не выявлено.

На аденокарциноме молочной железы Ca-755 противоопухолевая активность Абисилина® исследована в диапазоне доз от 10 до 2500 мг/кг при приеме внутрь масляного раствора препарата в трех режимах и посредством смазывания опухоли дважды в день в течение 10 дней (табл. 2). На Ca-755 статистически значимый противоопухолевый эффект Абисилина® был выявлен в дозе 10 мг/кг (ТРО составило 59 % на 7-й день опыта) и в дозе 100 мг/кг (ТРО=62 % на 7-й день и 65 % на 10-й день). В группе мышей, которым проводили наружное смазывание опухоли, УПЖ составило 27 % и было выше минимального критерия эффективности (УПЖ=25 %), несмотря на отсутствие эффекта торможения роста опухоли.

На эпидермоидной карциноме легкого Льюиса противоопухолевый эффект Абисилина® выявлен в дозе 100 и 150 мг/кг при пероральном введении на 7-й день после перевивки опухоли: ТРО=57 и 56 % соответственно (табл. 3). В последующие сроки наблюдения эффективность лечения снижалась. При этом УПЖ составило 22 и 14 % ($p > 0,05$). Умеренный противоопухолевый эффект Абисилина® наблюдался также в дозе 2500 мг/кг (ТРО=60 % на 13-й день опыта) при двукратном пероральном введении с интервалом 216 ч. Проведенные исследования выявили кратковременный противоопухолевый эффект Абисилина® на РШМ-5 после ежедневного перорального введения в течение 5 дней (табл. 4). Максимальное торможение роста опухоли показано на 7-е сутки от начала опыта в дозе 150 мг/кг (ТРО=61 %). Затем эффективность лечения снижалась. На аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ Абисилин® был неэффективен в дозах 50 и 100 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение 10 дней (табл. 5). Однако препарат проявлял слабый противоопухолевый эффект на 7-й день от начала лечения в дозе 500 мг/кг при ежедневном введении в течение 10 дней (ТРО=26 %) и на 28-й в дозе 2500 мг/кг и при двукратном введении с интервалом 96 ч (ТРО=26 %).

При изучении противоопухолевой активности Абисилина® на саркоме М-1 крыс показано, что препарат проявлял умеренную терапевтическую эффективность непосредственно после введения его в течение 5 дней в дозе 100 мг/кг (на 7-й день опыта): ТРО=54 %, $p < 0,05$ (табл. 6). Наблюдался также противоопухолевый эффект препарата при двукратном введении с интервалом 216 ч в дозе 2500 мг/кг на 7-й и 16-й дни от начала опыта (ТРО=68 % и 53 % соответственно).

При изучении противоопухолевой активности Абисилина® на асцитной форме опухоли Эрлиха при ежедневном пероральном введении в течение 10 дней в дозах 50, 100 и 150 мг/кг, а также на лимфоцитарной лейкемии Р-388 мышей в дозах 50 и 100 мг/кг препарат не оказывал противоопухолевого действия – УПЖ в исследуемых дозах было ниже минимального критерия эффективности.

Таблица 1

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на меланоме В-16

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %				УПЖ, %	Гибель от токсичности*
		дни после перевивки опухоли					
		7	13	17	21		
10	2-11	7	66**	25	14	14	0/8
50	2-11	0	34	9	8	8	0/8
100	2-11	63**	28	10	1	9	0/8
300	2-11	0	10	3	14	4	0/7
500	2-11	14	20	20	10	8	0/7
2500	2,6	62**	29	26	11	9	0/7
2500	2,11	13	47	11	16	9	0/8
0,25***	2-11	+5****	+15	+7	+6	0	0/8

*n/n – число павших к общему числу животных в группе;

**p<0,05 по отношению к нелеченному контролю;

***0,25 мл подсолнечного масла (растворитель);

****«+» означает стимуляцию роста опухоли.

Таблица 2

Противоопухолевая активность Абисилина® на аденокарциноме молочной железы Ca-755 мышей

Доза Абисилина® мг/кг	Дни введения	Путь введения	ТРО, %				УПЖ, %	Гибель от токсичности*
			Дни после перевивки опухоли					
			7	10	13	17		
10	2-11	per os	59**	38	35	17	4	0/7
50	2-11	per os	15	50	38	12	8	0/7
100	2-11	per os	62**	65**	35	20	3	0/7
300	2-11	per os	19	24	12	19	11	0/7
500	2-11	per os	24	28	32	0	0	0/8
2500	2,6	per os	38	26	21	9	0	0/8
2500	2,11	per os	13	10	5	30	1	1/8
0,25***	2-11	per os	+11****	+9	+6	+5	+1	0/8
20 %-ный масляный раствор	2-11	Смазывание опухоли 2 раза в день	11	7	14	0	27	0/8

*n/n – число павших к общему числу животных в группе; **p<0,05 по отношению к контролю;

0,25 мл подсолнечного масла (растворитель); * «+» означает стимуляцию роста опухоли.

Таблица 3

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на LLC

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %				УПЖ, %	Гибель от токсичности*
		Дни после перевивки опухоли					
		7	13	17	21		
50	2-11	4	3	2	5	7	0/8
100	2-11	51	11	18	12	13	0/8
150	2-11	57**	5	17	4	22	0/8
300	2-11	16	10	13	2	0	0/8
500	2-11	40	40	45	28	16	0/8
100	2-6	56**	18	13	6	14	0/8
2500	2,6	33	43***	39***	27	23	0/8
2500	2,11	53	60**	51***	43	16	0/8

*n/n – число павших к общему числу животных в группе;

p<0,05 по отношению к контролю; *p 0,05 по отношению к контролю.

Таблица 4

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на РШМ-5 мышей

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %					УПЖ, %	Гибель от токсичности*
		Дни после перевивки опухоли						
		7	12	19	25	31		
10	2-11	12	11	8	16	19	3	0/8
50	2-11	33	12	5	27	26	15	0/8
100	2-11	22	7	9	4	1	7	0/8
150	2-11	61**	2	8	7	2	10	0/8
500	2-11	13	5	2	13	20	0	0/8
2500	2,6	43	8	3	10	2	0	0/8
2500	2,11	35	16	35	31	32	9	0/8

*n/n – число павших к общему числу животных в группе;

**p<0,05 по отношению к контролю.

Таблица 5

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на аденокарциноме толстой кишки мышей КАТОЛ

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %				
		Дни после перевивки опухоли				
		7	12	21	28	34
50	2–11	8	9	3	6	0
100	2–11	3	2	6	18	0
500	2–11	26*	8	15	20	12
2500	2,6	19	22	0	26*	17

* $p > 0,05$ по отношению к контролю

Таблица 6

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на саркоме М-1 крыс

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %			
		дни после перевивки опухоли			
		7	12	16	21
50	2–11	8	7	10	2
100	2–11	54*	7	4	0
300	2–11	24	9	2	10
500	2–11	45	14	3	0
2500	2, 11	68*	23	53*	40

* $p < 0,05$ по отношению к контролю

В результате экспериментальных исследований, полученных при изучении противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях, определена оптимальная терапевтическая

доза Абисилина®, которая составила 100 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение 5 дней. Абисилин® не вызывал токсического действия у всех взятых в опыты животных.

Выводы

1. Показано, что Абисилин® при пероральном введении обладает противоопухолевой активностью в отношении 5 перевиваемых солидных опухолей при использовании в различных режимах применения: Са-755 (ТРО=59–65 %), меланома В-16 (ТРО=62–66 %), LLC (ТРО=56–60 %), РШМ-5 (ТРО=61 %), саркома М-1 (ТРО=68 %).
2. Не выявлено противоопухолевого действия Абисилина® на лимфоцитарной лейкемии Р-388 и асцитном варианте опухоли Эрлиха.
3. Терапевтическая доза Абисилина® при ежедневном пероральном введении животным с перевиваемыми солидными опухолями составляет 100 мг/кг.
4. Абисилин® не вызывает токсических проявлений в суммарной дозе 5000 мг/кг как при ежедневном введении в дозе 500 мг/кг в течение 10 дней, так и при двукратном введении в дозе 2500 мг/кг.

Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 2004. – Т. 1. – С. 93.
2. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата "Абисил-1" // Современные проблемы педиатрии и детской хирургии: Материалы Сибирско-Американской научно-практической конференции. Иркутск, 7-8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркутского университета, 1998. – С. 233–8.
3. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Под ред. Хабриева Р.У. – М.: Медицина, 2005. – С. 637–52.
4. Пентегова В.А., Дубовенко Ж.В., Ралдугин В.А., Шмидт Э.П. Терпеноиды хвойных растений. – Новосибирск: Наука, 1987. – 97 с.
5. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений. – Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 2000. – 664 с.
6. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая медицина, 2005. – 272 с.
7. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. – Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). – М.: Медицина, 1979. – 296 с.
8. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov A.U. et. al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition "Abisilin" exhibiting angiogenesis-inhibiting action.

УДК 615.277.3.015.2

*Л.А. Лацерус¹, Н.М. Пинигина¹, З.С. Смирнова², А.Ю. Барышников²***ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН®
В КОМБИНАЦИИ С ЦИСПЛАТИНОМ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ**¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация***Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»***адрес:** 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, **тел.:** +7(499)-722-2357**e-mail:** initium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

В работе изучено противоопухолевое действие Абисилина® в сочетании с цисплатином на перевиваемых опухолях мышей: аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ, аденокарциноме молочной железы Ca-755 и меланоме В-16. На АКАТОЛе показано, что Абисилин® при сочетании с цисплатином оказывает противоопухолевый эффект на опухоль равный 45–62 % ТРО в течение 16 дней. В то же время при монотерапии оба препарата не эффективны. На Ca-755 установлен потенцирующий противоопухолевый эффект Абисилина® при сочетании с цисплатином. На меланоме В-16 не выявлено преимуществ сочетанного применения Абисилина® с цисплатином по сравнению с противоопухолевым действием одного цисплатина. Полученные данные свидетельствуют о возможности сочетанного применения Абисилина® с цисплатином при некоторых видах опухолей.

Ключевые слова: Абисилин®, цисплатин, перевиваемые опухоли, противоопухолевая активность.*L.A. Latseruz¹, N.M. Pinigina¹, Z.S. Smirnova², A.Yu. Baryshnikov²***ANTICANCER ACTIVITY OF ABISILIN®
IN COMBINATION WITH CISPLATIN IN *IN VIVO* ANIMAL MODELS**¹Initium-Pharm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

We have studied the anticancer activity of Abisilin® in combination with Cisplatin in melanoma B-16, large intestine adenocarcinoma and mammary gland adenocarcinoma (Ca-755). Treatment of large intestine adenocarcinoma with Abisilin® for 16 days in combination with Cisplatin resulted in reduction of tumor for about 42–62 %. It is worth to note that monotherapy of both drugs was not effective. The combined treatment of Ca-755 tumor reveal an synergistic effect. On the other hand, combination of Abisilin® with Cisplatin has not possessed an advantage over Cisplatin as monotherapy in melanoma. The data obtained indicate that Abisilin® could be use in combination with Cisplatin in some tumors.

Key words: Abisilin®, Cisplatin, transplantable tumors, anticancer activity.**Введение**

Проведение современной химиотерапии, которое на том или ином этапе заболевания показано большинству онкологических больных, требует обновления информации о противоопухолевых препаратах и методиках их использования. В настоящее время большинство существующих противоопухолевых средств не обладают высокой избирательностью действия и оказывают побочные эффекты на нормальные ткани. В связи этим работы по созданию новых противоопухолевых средств направлены на получение таких препаратов, которые при максимальном ингибирующем действии на опухолевые клетки минимально повреждали бы нормальные клетки и ткани организма.

Вторым направлением развития химиотерапии является разработка комбинированного (сочетанного) применения лекарственных средств с целью уменьшения токсического действия противоопухолевых препаратов.

Особенно перспективен поиск новых препаратов среди веществ природного происхождения, в том числе относящихся к классу терпеноидов.

Эффективные противоопухолевые средства выявлены среди таких известных соединений терпеноидной структуры и их производных, как, например, таксаны, ретиноиды, токоферолы [2; 3].

Ранее нами была выявлена противоопухолевая активность Абисилина®, содержащего в своем составе природный комплекс терпеноидов, в отношении меланомы В-16, аденокарциномы молочной железы Ca-755, эпидермоидной карциномы легкого Льюиса, рака шейки матки РШМ-5 и саркомы М-1 крыс [5].

Целью настоящего исследования являлось изучение противоопухолевого действия препарата Абисилин® на перевиваемых опухолях мышей при его сочетанном применении с известным противоопухолевым препаратом цисплатином.

Материалы и методы

Работа выполнена на мышах-гибридах первого поколения BDF₁ (C₅₇Bl/6×DBA/2) и чистой линии BALB/c массой 20–25 г.

Мышей получали из отдела лабораторных животных РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и содержали на обычном рационе питания.

Противоопухолевое действие препаратов Абисилин® и цисплатин изучали на перевиваемых опухолях: меланоме В-16, аденокарциноме молочной железы Са-755 и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ. Лекарственная форма Абисилина® представляет собой 20 %-ный масляный раствор для перорального введения.

Абисилин® применяли перорально в виде масляного раствора в дозе 50 мг/кг равной ½ терапевтической при монотерапии. В качестве растворителя препарата использовалось подсолнечное масло. Препарат вводили животным ежедневно перорально в течение 10 дней при опухолях АКАТОЛ и Са-755, а также в течение 5 дней при меланоме В-16. Цисплатин применяли однократно, внутривенно в дозе 5 мг/кг. Лечение начинали через 48 ч после перевивки солидных опухолей. Наблюдение за животными проводили до их гибели от опухолевого процесса.

Группы формировались с учетом получения статистически достоверных результатов: контрольная не менее чем из 10–12 животных, опытная – из 8. Противоопухолевую активность оценивали по следующим критериям: ТРО, % и УПЖ, % подопытных животных по сравнению с контрольными [1; 4].

Статистическую значимость противоопухолевого эффекта Абисилина® определялась по методу Фишера–Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения противоопухолевой активности Абисилина® на перевиваемой аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ, проведенные в сочетании с цисплатином представлены в табл. 1.

Выводы

1. Показано, что на АКАТОЛе Абисилин® при сочетании с цисплатином оказывает противоопухолевый эффект, равный 45–62 % ТРО, в течение 16 дней, тогда как при монотерапии оба препарата неэффективны.
2. Установлен потенцирующий противоопухолевый эффект Абисилина® при сочетании с цисплатином на Са-755.
3. Полученные данные свидетельствуют о необходимости продолжить исследования по сочетанному применению Абисилина® с другими противоопухолевыми препаратами.

Таблица 1

Противоопухолевая активность препарата Абисилин® в сочетании с цисплатином на перевиваемой аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ мышей

Препараты	Доза, мг/кг	Дни введения	Путь введения	ТРО, %			
				Дни после перевивки опухоли			
				7	12	21	28
Абисилин® + цисплатин	50 + 5	2–11 + 2	per os в/бр	38	62*	40*	45*
Абисилин®	50	2–11	per os	8	9	3	6
цисплатин	5	2	в/бр	0	22	14	35

* $p < 0,05$ по отношению к цисплатину

Таблица 2

Противоопухолевая активность препарата Абисилин® в сочетании с цисплатином на перевиваемой аденокарциноме молочной железы Ca-755 мышей

Препараты	Доза, мг/кг	Дни введения	Путь введения	ТРО, %					УПЖ, %
				Дни после перевивки опухоли					
				7	11	14	18	22	
Абисилин® + цисплатин	50 + 5	2–11 + 2	per os в/бр	91	83*	66*	54*	49	20
Абисилин®	50	2–11	per os	13	0	7	6	6	3
цисплатин	5	2	в/бр	86	62	52	43	39	9

* $p < 0,05$ по отношению к цисплатину

Таблица 3

Противоопухолевая активность препарата Абисилин® в сочетании с цисплатином на перевиваемой меланоме В-16 мышей

Препараты	Доза, мг/кг	Дни введения	Путь введения	ТРО, %					УПЖ, %
				Дни после перевивки опухоли					
				7	9	11	17	21	
цисплатин + Абисилин®	5 50	2 2–6	в/бр per os	75*	74*	63	32	18	10
Абисилин®	50	2–6	per os	19	62	23	12	36	8
цисплатин	5	2	в/бр	80	83	65	19	9	10

* $p < 0,05$ по отношению к цисплатину

Литература

1. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Под ред. Хабриева Р.У. – М.: Медицина, 2005. – С. 637–52.
2. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. – Под ред. Н.И. Переводчиковой. – 2-е изд., доп. – М.: Практическая медицина, 2005. – 704 с.
3. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая медицина, 2005. – 272 с.
4. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. – Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). – М.: Медицина, 1979. – 296 с.
5. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et. al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition "Abisilin" exhibiting angiogenesis-inhibiting action.

(продолжение)

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, начина со второй. Каждый абзац должен начинаться с красной строки, которая устанавливается меню «Абзац».

Не следует использовать для красной строки клавишу Tab. Десятичные дроби следует писать через запятую. При наборе текста следует различать дефис и тире. Последнее вводится одновременным нажатием клавиш Ctrl+Alt+дефис с дополнительной клавиатуры при горящем указателе Num Lock. Набирая заголовки, названия разделов, таблиц, подписи и надписи на рисунках, точку в конце ставить не нужно. Выравнивать по центру и устанавливать красную строку для всего перечисленного также не нужно.

В начале статьи следует указать *имя, отчество и фамилии авторов* полностью, **НАЗВАНИЕ СТАТЬИ**, место работы в именительном падеже (если авторы работают в разных учреждениях, уточнить это дополнительно), должность и контактную информацию для каждого автора (почтовый **адрес, e-mail, телефон**). 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.

(продолжение см. на стр. 34)

УДК 616.24-006.6-033.2:616-036.87:616-006-092.9

Л.А. Лацерус¹, Н.М. Пинигина¹, А.М. Козлов², А.Ю. Барышников²**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН®
НА ПРОЦЕСС СПОНТАННОГО РЕЦИДИВИРОВАНИЯ
И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС МЫШЕЙ**¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация**

Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: initium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 24.11.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

На линейных мышах с перевиваемой карциномой легкого Льюис проведено изучение влияния препарата Абисилин®, содержащего в своем составе природный комплекс терпеноидов хвойных деревьев, на процесс спонтанного рецидивирования и метастазирования опухоли. Изучение активности Абисилина® в режиме адъювантной терапии (на фоне хирургического удаления первичной опухоли) выявило его способность ингибировать появление и развитие спонтанных рецидивов карциномы легкого Льюис. Наиболее эффективным оказалось применение препарата в дозе 60 и 100 мг/кг в течение 5 и 10 дней после хирургического удаления первичной опухоли. Применение препарата в дозе 120 мг/кг более эффективным было в предоперационном режиме. Послеоперационное применение Абисилина® на 45–46 % ингибировало процесс метастазирования карциномы легкого Льюис. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о возможности клинического изучения препарата Абисилин® как агента, способного повысить эффективность хирургического лечения злокачественных новообразований.

Ключевые слова: Абисилин®, спонтанные рецидивы экспериментальной опухоли, антирецидивная и антиметастатическая активность.

L.A. Latseruz¹, N.M. Pinigina¹, A.M. Kozlov², A.Yu. Baryshnikov²**THE INFLUENCE OF ABISILIN®
ON SPONTANEOUS RECURRENCE
AND METASTASIS FORMATION IN MICE WITH LEWIS CARCINOMA**¹Initium-Pharm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

We have studied the anticancer activity of Abisilin® in combination with Cisplatin in melanoma B-16, large intestine adenocarcinoma and mammary gland adenocarcinoma (Ca-755). Treatment of large intestine adenocarcinoma with Abisilin® for 16 days in combination with Cisplatin resulted in reduction of tumor for about 42–62 %. It is worth to note that monotherapy of both drugs was not effective. The combined treatment of Ca-755 tumor reveal an synergistic effect. On the other hand, combination of Abisilin® with Cisplatin has not possessed an advantage over Cisplatin as monotherapy in melanoma. The data obtained indicate that Abisilin® could be use in combination with Cisplatin in some tumors.

Key words: Abisilin®, Cisplatin, transplantable tumors, anticancer activity.

Введение

Лекарственный препарат Абисилин® (Абисил 20%-ный раствор в масле для перорального применения) содержит в своем составе природный комплекс терпеноидов, синтезируемый хвойными деревьями [7]. Субстанция препарата (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственная форма для местного и наружного применения, включенные в Государственный реестр лекарственных средств, проявляют антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие и другие фармакологически значимые эффекты [1; 5].

В настоящее время препарат Абисил – 20%-ный раствор в масле, для местного и наружного употребления, применяется в клинической практике как антимикробное, противовоспалительное и ранозаживляющее средство. При использовании препарата в лечении гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей и кожи установлено, что это лекарственное средство

оказывает болеутоляющий эффект, губительно действует на патогенную грамположительную и грамотрицательную микрофлору (стафилококки, энтерококки, псевдомонады, эшерихии, протей и др.), приводит к быстрому завершению стадии воспаления и стимуляции процессов регенерации тканей [4]. Широкий спектр фармакологической активности препарата, по-видимому, связан с многокомпонентным набором терпеноидов, входящих в его состав. Известно, что среди природных соединений этого класса найдены вещества с выраженными противоопухолевыми свойствами, такие например, как таксаны, каротиноиды, токоферолы и другие [6]. Представляет интерес изучение возможности применения препарата Абисилин® как потенциального агента, способного повысить эффективность хирургического лечения злокачественных опухолей.

Цель настоящей работы – изучение влияния препарата Абисилин® на процесс спонтанного рецидивирования и метастазирования на модели экспериментальной опухоли – LLC.

Материалы и методы

В экспериментах использовали мышей линии C₅₇BL/6 и гибридов первого поколения BDF₁, массой тела 20–25 г. Мышей получали из отдела лабораторных животных РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и содержали на обычном рационе питания. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с международными правилами работы с животными.

Влияние препарата на процесс спонтанного рецидивирования опухолей оценивали в экспериментах на животных на фоне резекции первичного опухолевого узла, развившегося после подкожной трансплантации животным 1×10⁶ клеток LLC в сроки (на 7–10 день), не обеспечивающие достижения радикальности операции [3].

Препарат Абисилин® применяли перорально в виде масляного раствора в дозах 60; 100 или 120 мг/кг до, после или до и после хирургического удаления первичного опухолевого узла, в течение 5 или 10 дней. В качестве растворителя использовали подсолнечное масло.

Предварительно перед операцией из общего количества животных формировали контрольную и терапевтические группы с опухолями размером 1,0–1,5 см³. В контрольной группе и в группе животных, получавших лечение, было от 7 до 10 особей. Оценку противоопухолевой, антирецидивной и антиметастатической активности препарата Абисилин® проводили в соответствии с методическими рекомендациями, изложенными в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [2; 3].

Статистическую обработку полученных результатов проводили по критерию Стьюдента, различия считали достоверными при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты экспериментальных исследований, характеризующие влияние Абисилина® на процесс спонтанного рецидивирования, а также влияние проведенной терапии на метастазирование карциномы легкого Льюис на фоне хирургического удаления первичных опухолей, представлены в табл. 1–3.

Таблица 1

Влияние Абисилина® на частоту и динамику спонтанного рецидивирования LLC у мышей BDF1

N	Воздействие	Дни введения	Доза, мг/кг	Сутки опыта		
				14	19	27
1	Контроль Масло + операция	3–12	0,1 мл/мышь	0/7	4/7	6/7
2	Абисилин® + операция	3–7	60	1/7	5/7	5/7
3	Абисилин® + операция	3–12	60	0/7	5/7	5/7
4	Операция + Абисилин®	8–12	60	0/7	3/7	3/7
5	Операция + Абисилин®	8–17	60	2/7	4/7	5/6
6	Абисилин® + операция	3–7	120	1/7	2/7	4/7
7	Абисилин® + операция	3–12	120	0/7	6/7	7/7
8	Операция + Абисилин®	8–12	120	2/7	4/7	6/7
9	Операция + Абисилин®	8–17	120	0/7	4/7	4/7

Первичная опухоль удалена на 7-е сутки. Абисилин® вводили per os

Как видно из табл. 1, влияние Абисилина® на процесс спонтанного рецидивирования LLC зависело от режима терапии.

В случае применения препарата в дозе 60 мг/кг в течение 5 дней наилучший эффект получен в режиме послеоперационной (адьювантной) терапии. К 27 суткам опыта рецидивы возникли у 3 из 7 мышей по сравнению с 6 из 7 в контрольной группе.

Применение препарата в предоперационном, а также комбинированном (пред- и послеоперационном) режимах было менее эффективным. В то же время, Абисилин® в дозе 120 мг/кг оказался наиболее эффективным в предоперационном режиме.

При умерщвлении этих животных на 35-е сутки опыта для оценки влияния проведенной терапии на процесс метастазирования карциномы Льюис получены данные, свидетельствующие о том, что Абисилин® в дозе 60 мг/кг также наиболее эффективен в режиме послеоперационной терапии (табл. 2). У животных, получавших Абисилин® в этом режиме (per os в дозе 60 мг/кг в течение 5 дней), отмечено торможение процесса метастазирования на 45 % (m_{cp} легких, пораженных Mts у леченных – 393,3 ± 160,0 мг по сравнению с 70,4 ± 237,3 мг у контрольных животных). Использование Абисилина® в дозе 120 мг/кг было менее эффективно во всех режимах.

Таблица 2

Влияние Абисилина® на спонтанное рецидивирование и метастазирование карциномы легкого Льюиса на фоне хирургического удаления первичной опухоли

N	Воздействие	Дни введения	Доза, мг/кг	п мышей с рецидивами	Забой животных на 35 сутки				Частота метастазирования*
					Рецидив		Легкие		
					Ср. масса, г	ТРО, %	Ср. масса, мг	ТРМ, %	
1	Контроль: масло + операция	3–12	0,1 мл/мышь	6/7	–	4,8±2,4	–	7/7[1++;6+++]	
2	Абисилин® + операция	3–7	60	5/7	+18	5,7±2,1	+25	7/7[1++;6+++]	
3	Абисилин® + операция	3–12	60	5/7	+25	471,7±167,8	34	6/6[1++;5+++]	
4	Операция® + Абисилин®	8–12	60	3/7	+20	393,3±160,0	45	7/7 [4++;3+++]	
5	Операция® + Абисилин®	8–17	60	5/7	+11	560,4±338,3	21	7/7[1+;1+++; 5+++]	
6	Абисилин® + операция	3–7	120	4/7	38	602,7±254,7	15	6/7[1-;2++;4+++]	
7	Абисилин® + операция	3–12	120	7/7	8	758,4±435,7	+7	7/7[1+;2++;4+++]	
8	Операция® + Абисилин®	8–12	120	6/7	+8	596,4±343,6	16	7/7[2++;5+++]	
9	Операция® + Абисилин®	8–17	120	4/7	+4	585,8±101,0	17	7/7[3++;4+++]	

Первичная опухоль удалена на 7-й день;

Абисилин® (или масло в контроле) вводили животным *per os*;

*субъективная оценка интенсивности метастазирования в условных единицах (от + до +++).

Таблица 3

Влияние сочетанного применения препарата Абисилин® и хирургического удаления подкожного опухолевого узла на метастазирование карциномы легкого Льюиса у мышей BDF₁

N	Воздействие	Дни введения препаратов	Доза, мг/кг	п мышей с рецидивом	Легкие*		Частота метастазирования
					Ср. масса, мг*	ТРМ, %*	
1	Контроль (хирургическое лечение)	–	–	5/7	532,4±418,7	–	7/7[1-;1+;1+++; 4+++]
2	Абисилин® + операция	2–6	100	3/7	323,5±267,2	39	7/7[2+;2+++]
3	Абисилин® + операция + Абисилин®	2–6, 11–15	100	4/7	515,0±263,5	3	5/6[1-; 1+; 3+++]
4	Операция + Абисилин®	11–15	100	3/7	287,0±43,3	46	5/6[1-;5+]
5	Операция + Абисилин® наружно (на шов)	11–15	100	3/7	687,9±273,4	+29**	6/7[1-; 1+; 5+++]

Первичную опухоль удалили на 10-е сутки;

Абисилин® вводили животным *per os*;

*результаты получены при забое животных на 40-е сутки опыта;

**стимуляция процесса.

В табл. 3 представлены результаты опыта по изучению эффективности сочетанного применения Абисилина® и хирургического лечения мышей с подкожно трансплантированной LLC.

В данном эксперименте первичные опухоли были удалены в более поздний срок – на 10-й день после трансплантации. Это привело к повышению уровня спонтанного рецидивирования опухолей животных в контрольной группе. На момент забоя животных на 40-е сутки после трансплантации опухолей рецидивы возникли у 5 из 7 мышей контрольной группы. Применение Абисилина® в дозе 100 мг/кг в соответствии с разными режимами (до операции; до и после операции; после операции) сопровождалось снижением частоты спонтанного рецидивирования опухолей. Более эффективным был режим послеоперационной терапии. Спонтанные рецидивы зарегистрированы только у 3 из 7 мышей, получавших лечение по данной схеме. Более того, у этих животных отмечено снижение интенсивности метастазирования на 46 %.

Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 2004. – Т. 1. – С. 93.
2. Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии опухолей. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Хабриева Р.У. – М.: Медицина, 2005. – С. 674–82.
3. Козлов А.М., Перетолчина Н.М., Киселев С.М. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению средств, способных ингибировать рецидивирование злокачественных опухолей. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Хабриева Р.У. – М.: Медицина, 2005. – С. 669–74.
4. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата «Абисил-1» //Современные проблемы педиатрии и детской хирургии: Материалы Сибирско-Американской научно-практической конференции. 7-8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркут. Ун-та, 1998. – С. 233–8.
5. Пинигина Н.М., Лацерус Л.А., Брайн Э.В. и др. Средство «Абисил-1», обладающее противовоспалительной, антибактериальной и ранозаживляющей активностью. Патент РФ №2054945 от 27.02.1996.
6. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая медицина, 2005. – 272 с.
7. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et. al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition “Abisilin” exhibiting angiogenesis-inhibitig action.

Заключение

Применение препарата Абисилин® в режиме адьювантной терапии (на фоне хирургического удаления первичной опухоли) выявило его способность ингибировать появление и развитие спонтанных рецидивов карциномы легкого Льюис.

Наиболее эффективным оказалось применение препарата в дозе 60 и 100 мг/кг в течение 5–10 дней после хирургического удаления первичной опухоли. Применение Абисилина® в дозе 120 мг/кг более эффективным было в предоперационном режиме.

Послеоперационное применение Абисилина® также на 45–46 % ингибировало процесс метастазирования карциномы легкого Льюис.

В результате проведенного исследования получены данные, свидетельствующие о возможности клинического изучения препарата Абисилин® как агента, способного повысить эффективность хирургического лечения злокачественных новообразований.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

УДК 616.24-006.6-033.2:616-036.87:615.277.3

Л.А. Лацерус¹, Н.М. Пинигина¹, А.М. Козлов², А.Ю. Барышников²**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН®
НА ПРОЦЕСС ИСКУССТВЕННОГО РЕЦИДИВИРОВАНИЯ
И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС МЫШЕЙ**¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация**

Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: initium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 24.11.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Проведено экспериментальное изучение влияния препарата Абисилин®, содержащего в своем составе природный комплекс терпеноидов хвойных деревьев, на развитие процесса искусственного рецидивирования и метастазирования LLC. Показано, что препарат Абисилин® обладает способностью ингибировать процесс искусственного рецидивирования LLC и подавлять метастазирование рецидивных опухолей на 25–46 %. Наилучший эффект достигался при пероральном и местном применении препарата в течение 7–10 дней в дозе 100–120 мг/кг. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективной возможности использования препарата Абисилин® как агента, способного повысить эффективность хирургического лечения злокачественных новообразований.

Ключевые слова: Абисилин®, перевиваемые опухоли, антирецидивная и антиметастатическая активность.L.A. Latseruz¹, N.M. Pinigina¹, A.M. Kozlov², A.Yu. Baryshnikov²**THE INFLUENCE OF ABISILIN®
ON ARTIFICIAL RECURRENCE
AND METASTASIS FORMATION IN MICE WITH LLC**¹Initium-Pharm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

In this study we have studied the effect of Abisilin® on the metastasis formation and artificial recurrence. We observed that Abisilin® inhibited the artificial recurrence and reduce the number of metastasis for about 25–46 %. Here we show that the local treatment with Abisilin® at the dose 100-120 mg/kg of body weight for 7-10 days or per os administration was more effective. Based on the data obtained, we conclude that Abisilin® could be used as an agent to increase the efficacy of surgical treatment of malignant tumors.

Key words: Abisilin®, transplanted tumor, anti-metastatic and anti-recurrent activity.**Введение**

Лекарственный пероральный препарат Абисилин® содержит в своем составе природный комплекс терпеноидов, полученный из хвойных деревьев семейства *Pinaceae* [6]. Субстанция препарата (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственная форма для местного и наружного применения, включенные в Государственный реестр лекарственных средств, проявляют антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие и другие фармакологически значимые эффекты [1; 5]. При использовании лекарственной формы Абисила для местного и наружного применения в лечении гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей и кожи было установлено, что это средство обладает многонаправленным действием, обеспечивающим снижение болевых ощущений, предотвращение бактериального загрязнения, ускоренное завершение стадии воспаления и стимуляцию процессов регенерации тканей [4].

Применение Абисила при разных путях введения может оказывать эффективное действие в профилактике и лечении гнойно-септических осложнений, которые наиболее часто возникают у он-

кологических больных со сниженными компенсаторными возможностями различных органов и систем. В связи с этим представляется целесообразным изучить его влияние на развитие опухолевого процесса при моделировании на животных.

Цель настоящего исследования – экспериментальное изучение влияния перорального терпеноидсодержащего препарата Абисилин® на процесс искусственного рецидивирования и метастазирования LLC мышей.

Материалы и методы

В экспериментах использовали мышей линии C₅₇BL₆ и гибридов первого поколения BDF₁ с массой тела 20–25 г с подкожно трансплантированной LLC. Мышей получали из отдела лабораторных животных РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и содержали на обычном рационе питания.

Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с международными правилами работы с животными.

Препарат Абисилин® применяли перорально (*per os*) и в некоторых опытах местно в виде масляного раствора в диапазоне доз от 60 до 400 мг/кг.

Таблица 1

Влияние Абисилина® на сроки появления искусственных рецидивов LLC у мышей BDF₁

N	Воздействие	Частота рецидивирования									
		Сутки опыта									
1	Масло 0,1 мл/мышь	7	10	12	14	17	21	26	30		
2	Абисилин® 400 мг/кг	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6		
3	Абисилин® 100 мг/кг	5/7	5/7	5/7	5/7	6/6*	6/6	6/6	6/6		
	Абисилин® и масло вводили <i>per os</i> всего 10 дней на 3–7 сутки и затем на 10–14 сутки; *1 мышь пала раньше контрольной	3/7	3/7	3/7	3/7	3/7	3/7	3/7	3/7		

Таблица 2

Влияние Абисилина® на рост искусственных рецидивов LLC у мышей BDF₁

N	Воздействие	Торможение роста опухоли, %									
		Сутки опыта									
1	Масло* 0,1 мл/мышь	7	10	12	14	17	21	26	30		
2	Абисилин® 400 мг/кг	36,0±64,7	104,0±117,8	394,8±367,2	677,3±495,2	1532,7±934,6	3207,7±1949,7	7337,7±3453,0	9455,0±3871,8		
3	Абисилин® 100 мг/кг	86	31	47	2	+21	+3	3	15		
	Абисилин® и масло вводили <i>per os</i> всего 10 дней на 3–7 сутки и затем на 10–14 сутки *в данной группе указан средний объем опухоли в мм ³	64	51	44	42	14	4	5	9		

Таблица 3

Влияние Абисилина® на продолжительность жизни животных при искусственном рецидивировании LLC у мышей BDF₁

N	Воздействие	п мышей, павших раньше контроля	п мышей без рецидивов более 90 суток	СПЖ, дни	УПЖ, %	Рецидив		Частота метастазирования
						Ср. масса, г	ТРО, %	
1	Масло 0,1 мл/мышь	–	0/6	42,6±3,5	–	8,9	–	6/6 1+; 2+++; 3+++
2	Абисилин® 100 мг/кг	0/7	3/7	61,0±19,1	43*	5,7	36	4/4 1+++; 3+++
3	Абисилин® 400 мг/кг	1/7	0/7	35,9±8,7	16	5,8	35	6/6 2+++; 4+++
	Абисилин® и масло вводили <i>per os</i> всего 10 дней на 3–7 сутки и затем на 10–14 сутки *- у 3/7 мышей рецидивы не возникли в течение 90 суток после трансплантации опухолевых клеток.							

Таблица 4

Влияние перорального и местного применения Абисилина® на рост искусственных рецидивов LLC у мышей BDF₁

N	Воздействие	Торможение роста рецидивной опухоли, %									
		Сутки опыта									
1	Контроль*	10	13	16	18	22	25				
2	Операция + масло на шов 0,3 мл/мышь	8,1	181,3	847,0	1297,0	2704,0	4996,7				
3	Операция + Абисилин® 100 мг/кг <i>per os</i>	+39	+64	+52	+76	+75	+56				
4	Операция + Абисилин® 100 мг/кг (на шов 0,3 мл/мышь)	78	67	47	23	10	8				
5	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 100 мг/кг + на шов 0,3 мл/мышь *в данной группе указан средний объем опухоли в мм ³	+95	+55	+54	+37	+60	+95				
		34	62	48	7	+5	34				

Таблица 5

Влияние перорального и местного применения Абисилина® на метастазирование искусственных рецидивов LLC у мышей BDF₁

N	Воздействие	Забой животных на 42 сутки				Частота метастазирования
		Опухоль		Легкие		
		м _{ср} , г	ТРО, %	м _{ср} , мг	ТРМ, %	
1	Контроль	6,5±1,8	-	312,1±27,1	-	8/8[1+;6++; 1+++]
2	Операция + масло на шов 0,3 мл/мышь	10,8±1,9	8	251,1±28,7	10	6/7[1-;1(++); 5+++]
3	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 100 мг/кг	6,0±2,3	+8	271,3±38,1	13	9/9[3+;6++; 1+++]
4	Операция + Абисилин® 100 мг/кг 0,3 мл на шов	8,3±1,9	+27	225,4±11,4	28	7/8[1-; 1+; 4(++); 2+++]
5	Операция + Абисилин® 100 мг/кг <i>per os</i> + 100 мг/кг × 0,3 мл на шов	8,0±1,8	+23	235,2±19,9	25	10/10[1±;3+; 1+(+++); 5+++]

Таблица 6

Влияние Абисилина® на динамику появления искусственных рецидивов LLC у мышей C57BL/6

N	Воздействие	Сутки после прививки	
		6	10
1	Операция + масло <i>per os</i> 0,1 мл/мышь	2/7 (29%)	7/7 (100%)
2	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 60 мг/кг	2/7 (29%)	6/7 (86%)
3	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 120 мг/кг	1/7 (14%)	4/7 (57%)
4	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 360 мг/кг	4/7 (57%)	7/7 (100%)
5	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 360 мг/кг + наружно 0,3 мл/мышь	4/7 (57%)	7/7 (100%)

Таблица 7

Влияние Абисилина® на рост искусственных рецидивов LLC у мышей C57BL/6

N	Воздействие	Торможение роста опухоли, %				
		Сутки опыта				
		10	13	18	21	26
1	Операция + масло <i>per os</i> * 0,1 мл/мышь	158,0	964,6	2466,3	4260,0	7212,9
2	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 360 мг/кг	15	+19	+42	+5	+10
3	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 120 мг/кг	67	39	38	10	10
4	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 60 мг/кг	40	38	28	15	9
5	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 360 мг/кг + наружно 0,3 мл/мышь	+39	+34	+1	15	3

*в данной группе указаны объемы p-ра препарата, мм³

Таблица 8

Влияние Абисилина® на рост и метастазирование искусственных рецидивов LLC у мышей C57BL/6

N	Воздействие	Забой животных на 33 сутки					Частота метастазирования
		Пали ранее	Рецидив		Легкие		
			м _{ср} , г	ТРО, %	м _{ср} , мг	ТРМ, %	
1	Операция + масло <i>per os</i> 0,1 мл/мышь	1/7	5,7±2,0	-	449,7±146,1	-	7/7 1+; 5++; 1+++
2	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 60 мг/кг	0/7	4,8±2,3	25	438,9±228,2	2	7/7 4+; 1++; 2+++
3	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 120 мг/кг	0/7	5,1±1,2	20	241,0±36,0	46	7/7 5+; 2+++
4	Операция + Абисилин® <i>per os</i> 360 мг/кг + наружно 0,3 мл/мышь	1/7	4,5±2,8	30	406,0±41,0	10	7/7 1+; 3++; 3+++

В качестве растворителя использовали подсолнечное масло. Изучение влияния препарата Абисилин® на частоту и сроки появления экспериментальной опухоли и динамику последующего развития проводили после имплантации 1×10^5 клеток LLC в 0,1 мл культуральной среды под хирургический шов, наложенный на предварительно произведенный разрез кожного покрова мыши [3].

После этого из общего числа животных формировали контрольную и терапевтические группы. В контрольной группе и в группе особей, получавших лечение, было от 7 до 10 животных. Оценку противоопухолевой, антирецидивной и антиметастатической активности препарата Абисилин® проводили в соответствии с методическими рекомендациями, изложенными в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [2; 3]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что применение Абисилина® перорально в дозах 400 и 100 мг/кг в течение 10 дней (пятидневный курс, затем двухдневный перерыв и еще один пятидневный курс) оказывало выраженное влияние на частоту и сроки появления искусственных рецидивов LLC после трансплантации под шов опухолевых клеток (табл. 1). При этом антирецидивный эффект терапии был выражен в значительно большей степени в случае использования препарата в дозе 100 мг/кг.

Так, в группе животных, получавших Абисилин® в дозе 400 мг/кг, у 2 из 7 рецидивы появились только спустя 14 дней после трансплантации под хирургический шов опухолевых клеток, в то время как в группе животных, получавших Абисилин® в дозе 100 мг/кг, к 12 суткам опыта рецидивы появились у 3 из 7 животных, а у оставшейся части искусственные рецидивы не были обнаружены в течение 90 дней наблюдения. Изучение динамики развития рецидивных опухолей на фоне проведенного лечения препаратом Абисилин® показало наличие ингибирующего влияния терапии в случае индукции искусственных рецидивов трансплантацией под шов 1×10^5 опухолевых клеток, которое продолжалось в течение 10–12 дней после начала эксперимента (табл. 2).

Применение Абисилина® в разовой дозе 100 мг/кг в течение 10 дней увеличивало среднюю продолжительность жизни животных после индукции искусственных рецидивов после трансплантации 1×10^5 опухолевых клеток на 43 % по сравнению с контролем (табл. 3). Контрольные животные прожили в среднем $42,6 \pm 3,5$ дня; животные, леченные Абисилином® в дозе 100 мг/кг – $61,0 \pm 19,1$ день. Применение препарата по той же схеме в дозе 400 мг/кг было менее эффективно. Для усиления антирецидивного эффекта в ряде экспериментов Абисилин® применяли перорально и местно, нанося его на шов, под который трансплантировали опухолевые клетки.

Для перорального применения использовали дозу 100 мг/кг, местно применяли препарат в той же дозе, разведенной в 0,3 мл подсолнечного масла. Перорально и местно препарат Абисилин® применяли с 1-го по 9-й дни после индукции искусственных рецидивов. Полученные результаты представлены в табл. 4 и 5.

Как видно из данных, представленных в табл. 4, пероральное применение Абисилина® умеренно ингибировало развитие рецидивов, в то время как ежедневное в течение 9 последующих дней нанесение масляного раствора Абисилина® на хирургический шов, наложенный на разрез кожного покрова, под который имплантировано 1×10^5 опухолевых клеток, также, как и в случае применения только растительного масла, значительно стимулировало развитие искусственных рецидивов. На фоне одновременного перорального и местного применения препарата отмечен небольшой ингибирующий эффект, однако выраженный в меньшей степени, чем в случае только его перорального применения. В табл. 5 представлены данные, полученные при вскрытии животных на 42-й день после индукции искусственных рецидивов, характеризующие влияние проведенной терапии на процесс метастазирования рецидивных опухолей.

Представленные данные свидетельствуют о способности Абисилина® при местном применении стимулировать развитие рецидивных опухолей на 27 %. Однако на этом фоне стимуляция метастазирования не выявлена. Более того, в группах животных, получавших Абисилин® местно, отмечено ингибирование процесса метастазирования рецидивных опухолей на 28 %, а в группе животных, получавших Абисилин® местно и перорально, – на 25 %. В серии экспериментов, выполненных с целью воспроизведения представленных выше данных, препарат Абисилин® вводили животным в течение 10 последующих дней, начиная сразу после индукции искусственных рецидивов. При этом были использованы 3 возрастающие дозы препарата: 60; 120 и 360 мг/кг. Животные одной группы получали одновременно большую дозу Абисилина® перорально и местно ежедневно в течение 10 дней в зону хирургического шва (табл. 6), пероральное применение Абисилина® ингибировало динамику появления искусственных рецидивов LLC.

Так, у в контрольной группе на 6-е сутки рецидивы появились у 2/7 животных (29 %), а на 10-е – у всех 7/7 (100 %). В то же время в группе животных, получавших Абисилин® в дозе 120 мг/кг на 6-е сутки, рецидивы были выявлены у 1/7 мышей, а на 10-е сутки – у 4/7 (соответственно в 14 и 57 % случаев). Более того, даже на 13-е сутки рецидивы были выявлены только у 5/7 (71%) случаев. Применение Абисилина® в меньшей и большей дозах было менее эффективно. Дополнительное местное применение препарата не повышало антирецидивного эффекта терапии. Проведенное лечение Абисилином® в дозе 120 мг/кг не только ингибировало динамику появления искусственных рецидивов, но и тормозило темпы роста развившихся рецидивных опухолей (табл. 7).

На 10–18-е сутки средний объем рецидивных опухолей мышей, получавших Абисилин® в дозе 120 мг/кг, был на 38–67 % меньше по сравнению с таковыми контрольных животных. Дополнительное местное применение Абисилина® не улучшало результаты лечения. Применение Абисилина® в дозе 120 мг/кг перорально в течение 10 последующих дней снижало интенсивность метастазирования рецидивных опухолей на 46 % (табл. 8). Средняя масса легких, пораженных метастазами, у животных, получавших Абисилин® в дозе 120 мг/кг, была равна $241,0 \pm 36,0$ мг по сравнению с $449,7 \pm 146,1$ мг у таковых контрольной группы. Таким образом, полученные в эксперименте результаты, свидетельствуют о том, что препарат Абисилин® обладает способностью умеренно ингибировать процесс рецидивирования и метастазирования опухолей.

Выводы

1. В экспериментах установлено, что препарат Абисилин® обладает способностью ингибировать частоту искусственного рецидивирования LLC и снижает темпы роста развившихся рецидивных опухолей (ТРО=38–67 %).
2. Выявлено ингибирование процесса метастазирования рецидивных опухолей карциномы легкого Льюис при пероральном и местном применении препарата Абисилин® (ТРМ=25–46 %).

Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 2004. – Т. 1. – С. 93.
2. Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии опухолей. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Хабриева Р.У. – М.: Медицина, 2005. – С. 674–82.
3. Козлов А.М., Перетолчина Н.М., Киселев С.М. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению средств, способных ингибировать рецидивирование злокачественных опухолей. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Хабриева Р.У. – М.: Медицина, 2005. – С. 669–74.
4. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата «Абисил-1» // Современные проблемы педиатрии и детской хирургии: Материалы Сибирско-Американской научно-практической конференции. 7-8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1998. – С. 233–8.
5. Пинигина Н.М., Лацерус Л.А., Брайн Э.В. и др. Средство «Абисил-1», обладающее противовоспалительной, антибактериальной и ранозаживляющей активностью. Патент РФ №2054945 от 27.02.1996. РСТ/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition "Abisilin" exhibiting angiogenesis-inhibiting action.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**

(продолжение)

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 смакетированы 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.

(продолжение см. на стр. 42)

УДК 615.277.3.032:615.9

Л.А. Лацерус¹, И.В. Березовская², В.И. Рымарцев², Н.М. Пинигина¹**ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН®
ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ», Купавна**Контактная информация**

Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: initium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Проведено доклиническое изучение безопасности препарата Абисилин®, содержащего в своем составе природный комплекс терпенов хвойных деревьев семейства *Pinaceae*. По результатам определения острой токсичности Абисилин® отнесен к IV классу опасности в соответствии с ГОСТ-ом 12.1.007-76. Пероральное введение кроликам и крысам Абисилина® в течение 6 мес. не вызывало достоверных функциональных и структурных изменений в органах и тканях. У отдельных подопытных животных препарат оказывал слабое местное раздражающее действие на слизистую желудочно-кишечного тракта. Воздействие Абисилина® в дозах, десятикратно превышающих терапевтическую, сопровождалось у части животных незначительными функциональными и гистологическими изменениями, которые восстанавливались через 1 мес после отмены препарата. Результаты проведенного исследования в достаточной мере обосновывают безопасность перорального применения препарата Абисилин®.

Ключевые слова: Абисилин®, токсичность, побочные эффекты, безопасность.Л.А. Latseruz¹, I.V. Berezovskaya², V.I. Rymartsev², N.M. Pinigina¹**THE PRECLINICAL TRIAL OF ABISILIN®
WHEN ADMINISTRATION PER OS**¹Initium-pharm LTD, Moscow²Russian Biological Active Drugs' Safety Research Center, Kupavna**Abstract**

The preclinical trial of Abisilin® safety demonstrates that the drug belongs to Class IV safety drugs. When rabbits or rats were given Abisilin® *per os* for 6 months, no significant functional or structural changes were observed in any tissue or organs. The weak irritation of mucous coat of stomach was obvious in few animals. If the dose of Abisilin® was increased 10-fold, some functional or histological changes were seen. These changes restored in a month after drug withdrawal. Based on data obtained, we conclude that this drug is safety for *per os* administration.

Key words: Abisilin®, toxicity, side-effect, safety.**Введение**

Лекарственный препарат Абисилин® (Абисил 20 %-ный раствор в масле для перорального применения), содержит в своем составе природный комплекс терпенов (изопреноидов), синтезируемый хвойными деревьями семейства *Pinaceae*. Субстанция препарата (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственная форма для местного и наружного применения, включенные в Государственный реестр лекарственных средств, обладают антимикробными, противовоспалительными, ранозаживляющими, иммуномодулирующими и другими фармакологически значимыми эффектами [3; 6; 7].

При экспериментальном исследовании противоопухолевой активности установлено, что терпеносодержащий препарат Абисилин® обладает противоопухолевой активностью в отношении перевиваемых опухолей мышей – меланомы В-16, аденокарциномы молочной железы Са-755, LLC, рака шейки матки (РШМ-5) и саркомы М-1 крыс [9].

В соответствии с существующими требованиями ЛФ зарегистрированного лекарственного препарата с новым путем введения подлежит обязательному токсикологическому исследованию.

Цель настоящего исследования – доклиническое токсикологическое изучение терпеносодержащего перорального препарата Абисилин®.

Материалы и методы

Для проведения токсикологических исследований использовали препарат Абисилин® серии № 010908, представленный ООО «Инитиум-Фарм» и соответствующий проекту нормативной документации.

Общетоксическое действие препарата изучали в соответствии с методическими рекомендациями [1].

Хронический эксперимент проводили на кроликах породы шиншилла (♂ m_{cp} 2,70±0,06 кг и ♀ m_{cp} 2,59±0,06 кг) и на нелинейных белых крысах (♂ $ср.$ 38±5 г и ♀ $ср.$ 06±4 г).

Все подопытные кролики были разделены на 5 групп по 8 особей в каждой. Группы формировались методом случайных чисел с использованием массы тела в качестве ведущего признака.

Исследуемый препарат вводили кроликам перорально ежедневно однократно в течение 6 мес в дозах 70,0 мг/кг (терапевтическая) и 700,0 мг/кг, десятикратно превышающих разовую терапевтическую дозу для кроликов.

Межвидовой расчет доз проводили по методу И.П. Улановой [1] путем экстраполяции с терапевтической дозы для крыс (200 мг/кг).

Расчет:

$$\frac{(200 \text{ мг/кг} \cdot 6,5)}{18,5} = 70 \text{ мг/кг}$$

Подопытные крысы были разделены на 7 групп по 15 особей в каждой. Исследуемый препарат вводили внутривентриально в виде 20 %-ного масляного раствора ежедневно однократно в течение 6 мес. в дозах 200,0 (терапевтическая); 1000,0 и 2000,0 мг/кг в объеме 0,1; 0,5 и 1,0 мл на 100 г массы тела соответственно. Контрольным животным вводили подсолнечное масло в объеме 0,5 мл на 100 г массы тела. Терапевтическая доза для крыс обоснована фармакологическими исследованиями противоопухолевого действия Абисилина®.

Общее состояние подопытных животных оценивали по внешнему виду, поведенческим реакциям и динамике массы тела.

Состояние сердечно-сосудистой системы изучали с помощью ЭКГ во втором отведении без наркоза с использованием компьютерной приставки в виде комплекса «Поли-Спектр-8/В» при скорости регистрации 200 мм/сек и соответствии 1 мв – 20 мм.

О состоянии периферической крови судили по количеству эритроцитов и лейкоцитов (подсчет в камере Горяева), тромбоцитов (подсчет в мазках крови) и ретикулоцитов – подсчет в мазках крови, окрашенных бриллиантовым крезиловым синим, лейкограмме – подсчет в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза, гемоглобина (измерение на гемоглобинометре ГФ3) [4], параметрам свертывания крови (коагулограф Н-334).

Программа изучения общетоксического действия Абисилина® включала набор тестов для оценки функции печени. Белоксинтезирующую функцию печени изучали по содержанию общего белка с помощью биуретовой реакции, липидную – по содержанию общих липидов колориметрическим методом с реактивом, состоящим из ванилина и фосфорной кислоты, содержанию общего холестерина по методу Ильяка.

Функциональное состояние поджелудочной железы и косвенно углеводную функцию печени определяли по содержанию глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом [5].

Функцию выделительной системы исследовали по следующей программе: спонтанный диурез за 18 ч, удельная масса мочи весовым методом, рН мочи, мочевины в сыворотке крови и моче диацетилмонооксимным методом с последующим расчетом СКМО; содержание креатинина в сыворотке крови и моче по реакции Яффе и определение клиренса креатинина как показателя клубочковой фильтрации; содержание ионов калия и натрия в сыворотке крови и их выведение с мочой методом пламенной фотометрии на ПФМ-1 [2].

По завершению эксперимента подопытных животных умерщвляли (наркоз и электрошок для кроликов, наркоз и дислокация для крыс), вскрывали, определяли относительную массу органов. Для патоморфологических исследований были взяты от подопытных животных всех групп следующие органы: сердце, лимфатические узлы, селезенка, щитовидная и парашитовидная железы, тимус, надпочечники, желудок, тонкий и толстый кишечник, поджелудочная железа, печень, легкие, почки, семенники, яичники.

Гистологический материал фиксировали в 10 %-ном формалине, обезжировали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Материалы экспериментов подвергали статистической обработке общепринятым методом по Стьюденту (программа на CELERON-366) [8].

Результаты и обсуждение

Определение острой токсичности проводили на нелинейных белых мышах массой 18–20 г при однократном внутривентриальном введении Абисилина® в дозе 10000 мг/кг (100-кратно превышающей терапевтическую дозу) в объеме 1,0 мл на 20 г массы тела. Интоксикация проявлялась беспокойством, учащенным дыханием, увеличением двигательной активности, группированием. Гибель животных не наблюдали в течение 14 дней, т.е. всего периода наблюдения.

По результатам изучения острой токсичности препарат Абисилин® может быть отнесен к IV классу опасности в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76. В экспериментах по определению хронической токсичности Абисилина® не выявлено существенных различий в его влиянии на подопытных кроликов и крыс.

Интегральные показатели

Прирост массы тела при воздействии изучаемого препарата не имел статистически значимых различий с контролем. Поведенческие реакции подопытных животных не отличались существенно от контрольных животных.

Состояние периферической крови

При воздействии Абисилина® в течение 3 мес у подопытных кроликов отмечены увеличение палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфопения и эозинопения под влиянием большой дозы (700,0 мг/кг). Остальные показатели клеточного состава периферической крови и концентрации гемоглобина не отличались от контроля. В конце эксперимента увеличение палочкоядерных нейтрофилов наблюдалось только у кроликов-самок.

При воздействии Абисилина® в течение месяца в периферической крови крыс всех подопытных групп не было существенных отличий от контроля (эритроциты, лейкоциты, гемоглобин, ретикулоциты, лейкоцитарная формула). Через 3 мес введения препарата у крыс-самок под влиянием терапевтической дозы отмечена незначительная нейтропения и снижение гемоглобина под воздействием большой дозы. По завершению эксперимента состояние периферической крови не отличается от контроля. Снижение цветового показателя у крыс-самок в пределах сезонной нормы. Абисилин® в течение 90 дней эксперимента не влиял на состояние свертывания крови подопытных животных всех групп. После 6 мес введения препарата в большой дозе отмечалось увеличение времени начала свертывания крови.

Функциональное состояние печени и поджелудочной железы

Воздействие Абисилина® в течение 3 мес не оказывало влияния на содержание общего белка и глюкозы в сыворотке крови у всех подопытных кроликов и крыс. Абисилин® в дозе 700 мг/кг вызывал увеличение общих липидов у кроликов-самок после 6 мес введения (табл.1).

Таблица 1

Воздействие Абисилина® на содержание общих липидов в сыворотке крови кроликов ($M \pm m$; $n=8$)

№	Пол	Доза, мг/кг	Общие липиды сыворотки крови (г/л) под воздействием Абисилина®			
			До начала	Через 1 мес	Через 3 мес	Через 6 мес
1	♂	70,0	2,46 0,04	2,50 0,09	2,48 0,08	3,06 0,10
2	♂	700,0	2,46 0,04	2,49 0,07	2,53 0,09	2,39 0,49
3	♂	контроль	2,53 0,05	2,59 0,05	2,56 0,06	2,87 0,12
4	♀	700,0	2,57 0,04	2,57 0,05	2,59 0,07	3,37* 0,08
5	♀	контроль	2,54 0,04	2,63 0,06	2,54 0,07	2,56 0,15

* $P < 0,001$

Таблица 2

Воздействие Абисилина® на концентрацию глюкозы в сыворотке крови крыс ($M \pm m$; $n=10$)

№	Пол	Доза, мг/кг	Глюкоза сыворотки крови (ммМ/л)				
			До начала	Через 1 мес	Через 3 мес	Через 6 мес	Восстановление ($n=5$)
1	♂	200,0	6,62 0,08	6,32 0,11	6,32 0,07	6,31** 0,27	5,66 0,09
2	♂	1000,0	6,64 0,09	7,05 0,23	6,93 0,15	7,03 0,14	5,63 0,10
3	♂	2000,0	6,68 0,08	6,88 0,08	6,87 0,07	7,03 0,07	5,67 0,09
4	♂	контроль	6,65 0,11	6,67 0,14	6,69 0,11	6,86 0,08	5,71 0,08
5	♀	200,0	6,65 0,11	6,67 0,14	6,69 0,11	6,86 0,08	5,71 0,08
6	♀	2000,0	6,54 0,07	7,35* 0,31	7,32*** 0,18	7,34**** 0,17	5,96 0,04
7	♀	контроль	6,57 0,07	6,59 0,08	6,56 0,09	6,52 0,069	5,92 0,09

* $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,002$; **** $P < 0,001$.

Таблица 3

Воздействие Абисилина® на концентрацию общего холестерина в сыворотке крови крыс ($M \pm m$; $n=10$)

№	Пол	Доза, мг/кг	Общий холестерин, ммМ/л, на фоне воздействия Абисилина®				
			До начала	Через 1 мес	Через 3 мес	Через 6 мес	Восстановление ($n=5$)
1	♂	200,0	2,29 0,03	2,34 0,05	2,35*** 0,05	2,41 0,05	1,95 0,04
2	♂	1000,0	2,36 0,02	2,42 0,04	2,40** 0,05	2,51 0,04	1,91 0,04
3	♂	2000,0	2,41 0,05	2,88*** 0,17	2,74 0,11	2,84* 0,12	1,93 0,06
4	♂	контроль	2,35 0,02	2,34 0,02	2,58 0,05	2,55 0,05	1,97 0,05
5	♀	200,0	2,03 0,20	2,61**** 0,06	2,61**** 0,06	2,66**** 0,06	1,83 0,03
6	♀	2000,0	2,19 0,04	2,47**** 0,08	2,46**** 0,07	2,58**** 0,06	1,82 0,04
7	♀	контроль	2,09 0,04	2,07 0,04	2,07 0,03	2,06 0,04	1,96 0,06

* $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,01$; **** $P < 0,001$.

У крыс после 6 мес введения препарата в терапевтической дозе констатировали гипогликемию. В большой дозе у крыс самок наблюдалась гипергликемия. После восстановительного периода содержание глюкозы в сыворотке крови крыс нормализовалось (табл. 2). Абисилин® вызывал увеличение концентрации общих липидов у крыс-самцов при введении в дозе 1000 и 2000 мг/кг, а у крыс-самок – 200 и 2000 мг/кг. Через мес восстановительного периода установлена нормализация концентрации общих липидов в сыворотке крови у всех подопытных животных. Под влиянием терапевтических доз Абисилина® отмечено снижение концентрации общего холестерина в сыворотке крови крыс (табл. 3). Гиперхолестеринемия установлена через 1 и 6 мес введения Абисилина® в дозе 2000 мг/кг крысам-самцам. У крыс-самок гиперхолестеринемия наблюдалась в течение всего эксперимента в дозах 200 и 2000 мг/кг Абисилина®. Нормализация концентрации общего холестерина отмечена через мес восстановительного периода.

Функциональное состояние почек

Под воздействием Абисилина® через 1; 3, и 6 мес у всех подопытных кроликов и крыс функциональные показатели выделительной системы не отличались от контроля. Абисилин® не влиял в течение 6 мес на секреторную функцию почек, на минеральный обмен и клубочковую фильтрацию почек. Некоторые изменения азотистого обмена отмечены под влиянием большой дозы после 6 мес введения препарата. Так, у кроликов-самцов наблюдали увеличение креатинина в сыворотке крови и моче, у самок – только в моче без существенных изменений клиренса креатинина.

Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы

На протяжении всего периода воздействия Абисилина® со стороны изучавшихся показателей электрокардиограммы всех подопытных групп не отмечено существенных отличий от контроля. Изменения параметров ЭКГ не имели дозозависимого характера и укладывались в сезонные нормы показателей. Слабый кардиотропный эффект наблюдался только у крыс-самок. После отмены препарата в течение мес параметры ЭКГ самок не отличались от контроля.

Местное раздражающее действие

После 6 мес внутрижелудочного введения Абисилина® макроскопически не обнаружено местного раздражающего действия. По результатам гистологических исследований установлено дозозависимое местное раздражающее действие, наиболее выраженное при введении крысам в дозе 2000 мг/кг.

Литература

1. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. – Под ред. Хабриева Р.У. – М.: Медицина, 2005. – С. 41–54.
2. Берхин Е.Б., Иванов Ю.И. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена. – Барнаул: Алтайское книжн. издательство, 1972. – 199 с.
3. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание. – Москва, 2008. – С. 85.
4. Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А. Клиническая гематология животных. – М.: Колос, 1974. – 285 с.
5. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 363 с.
6. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата «Абисил-1» // Современные проблемы педиатрии и детской хирургии: Материалы Сибирско-Американской научно-практической конференции. 7-8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1998. – С. 233–8.
7. Пинигина Н.М., Лацерус Л.А., Брайн Э.В. и др. Средство «Абисил-1», обладающее противовоспалительной, антибактериальной и ранозаживляющей активностью. Патент РФ №2054945 от 27.02.1996.
8. Урбах В.Ю. Биометрические методы. – М.: Наука, 1964. – С. 99–133, 147–54.
9. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et al. Anticancer terpenoid pharmaceutical composition "Abisilin" with angiogenesisinhibition action.

Патоморфологические исследования

За время проведения эксперимента через 3 мес погиб только один кролик (с признаками пневмонии), гибели крыс не зарегистрировано. После умерщвления осмотр животных показал, что все они нормально упитаны, имеют правильное телосложение, опрятны, волосяной покров и естественные отверстия чистые. При макроскопическом исследовании внутренних органов групп контроля и подопытных групп во время вскрытия каких-либо особенностей не выявлено.

Определение относительной массы органов подопытных кроликов не выявило существенных отличий от контроля при воздействии препарата в изученных дозах. Отмечалось увеличение массы печени у крыс-самцов после введения Абисилина® в дозах 200; 1000 и 2000 мг/кг и у крыс-самок после введения большой дозы.

При максимальной дозе испытуемого препарата (700 мг/кг для кроликов и 2000 мг/кг для крыс) у подопытных животных обнаружены слабо выраженные явления интоксикации в виде умеренного венозного полнокровия паренхиматозных органов, гидропической дистрофии кардиомиоцитов, гепатозитов, небольшой реакции иммунных органов у отдельных животных.

У животных всех испытуемых групп выявлены изменения в месте введения препарата в слизистой оболочке желудка, тонкой и толстой кишки. Пищевод без патологических изменений. В желудке обнаружена небольшая гиперсекреция слизи и мелкоочаговая десквамация эпителия. В тонкой кишке – гиперсекреция слизи, очаговая десквамация эпителия, макрофагальная реакция, очаговая атрофия желез, очаговый фиброз собственной пластинки слизистой оболочки, а также микроэрозии и микроизъязвления слизистой оболочки.

В толстой кишке – умеренная гиперсекреция слизи, очаговая десквамация эпителия, микроэрозии у отдельных животных. Вышеописанные изменения в желудочно-кишечном тракте в основном выявлялись у подопытных животных при введении максимальных доз Абисилина®. При терапевтической дозе подобные изменения были найдены у отдельных животных и проявлялись большей частью слабо. У отдельных животных группы контроля, получавших 0,5 мл/100 г подсолнечного масла, отмечена слабо выраженная гиперсекреция слизи и мелкоочаговая десквамация в тонкой и толстой кишке. Гистологические исследования органов и тканей подопытных животных всех групп спустя мес после отмены Абисилина® подтвердили восстановление ранее установленных структурных изменений.

УДК 616-089-06:616.9:615.277.3

Л.А. Лацеруз

**ПРИМЕНЕНИЕ ТЕРПЕНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА АБИСИЛ
В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ**

ООО «Инитиум-Фарм», Москва

Контактная информация

Лацеруз Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: initium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Установлено, что лекарственный препарат Абисил, содержащий в своем составе природный набор терпеноидов пихты сибирской (*Abies sibirica* L.), обладает многонаправленным действием, характеризующимся антимикробным, противовоспалительным, ранозаживляющим и обезболивающим эффектами. Анализ результатов клинического применения препарата показал его эффективность при лечении и профилактике гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей.

Ключевые слова: Абисил, терпеноиды, хирургическая инфекция.

A.L. Latserez

**ABISIL IN TREATMENT AND PREVENTION
OF SURGICAL INFECTIONS**

Initium-pharm LTD, Moscow

Abstract

In this study we show that Abisil, the complex of terpenoids extracted from *Abies sibirica* L., possesses the antibacterial, antiinflammatory and wound healing activities. This drug is also effective as anesthetic. The clinical study illustrates the efficacy of this drug in the treatment and prevention of pyoinflammatory diseases of skin and soft tissue.

Key words: Abisil, terpenoids, surgical infection.**Введение**

Несмотря на все достижения современной медицины, хирургическая инфекция остается актуальной проблемой, так как она зачастую нивелирует огромные усилия врачей, затраченные на сложные операции. В общей структуре хирургической заболеваемости в течение последних двух десятилетий отмечается неуклонное увеличение острых гнойно-воспалительных заболеваний [1].

Особенно остро стоит вопрос развития раневой инфекции у оперированных онкологических больных, в основе которой лежит комбинированный вторичный иммунодефицит, вызванный проводимой химиотерапией, лучевой терапией и многими другими факторами [3; 4].

Еще совсем недавно успехи, связанные с применением антибиотиков, создавали иллюзию решения проблемы хирургической инфекции. Однако следует признать: они не в полной мере оправдали возложенные на них надежды. Клинические наблюдения показали, что наряду с применением антибактериальных препаратов широкого спектра действия увеличивается число антибиотико-резистентных штаммов патогенных микроорганизмов, частота аллергических реакций и соответственно тяжесть инфекционных осложнений [4].

В настоящее время приходит понимание того, что наряду с известными традиционно применяемыми способами лечения гнойно-воспалительных заболеваний необходимо внедрять в практику лечебно-профилактические препараты с многоплановым действием, которые можно применять длительное время в качестве терапии сопровождения

как на госпитальном, так и на амбулаторно-поликлиническом этапах лечения. К таким лекарственным средствам можно отнести препараты из растительного сырья, особенно комплексы, содержащие биологически активные вещества, обладающие выраженными антимикробными, противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами, при этом лишённые токсических или иных негативных побочных эффектов.

Из новых отечественных препаратов особого внимания заслуживает лекарственное средство Абисил (20 %-ный раствор в масле для местного и наружного применения), содержащее в своем составе природный набор терпеноидов пихты сибирской (*Abies sibirica* L.). В ходе проведения доклинических исследований у препарата выявлены такие важные активности как антимикробная, противовоспалительная, ранозаживляющая, иммуномодулирующая и обезболивающая [5; 6]. Кроме этого, у пероральной лекарственной формы Абисила (Абисилин®) обнаружена противоопухолевая активность, характеризующаяся торможением роста ряда перевиваемых опухолей, индуцированием апоптоза опухолевых клеток, способностью ингибировать процесс метастазирования и рецидивирования карциномы легкого Льюис, а также проявлением антиангиогенных свойств *in vitro* и *in vivo* [8]. Следует заметить, что у препаратов, содержащих растительные терпеноиды, не формируется резистентности к микроорганизмам или она выражена в меньшей степени [7].

Цель настоящего исследования – изучение эффективности применения препарата Абисил в лечении и профилактике гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей.

Материалы и методы

Антимикробное действие препарата Абисил в отношении эталонных и клинических штаммов микроорганизмов изучено на базе лаборатории химиотерапии Государственного центра антибиотиков с применением метода двукратных серийных разведений от 1:2 до 1:2000, при микробной нагрузке 10^3 и 10^5 КОЕ/мл [2].

Спектр и степень противомикробной активности препарата устанавливали, определяя минимальную подавляющую (МПК) и бактерицидную (МБК) концентрации. Выделение и идентификацию патогенной микрофлоры от больных проводили общепринятыми методами.

Клиническая оценка эффективности Абисила при лечении больных с гнойно-воспалительными заболеваниями кожи и мягких тканей проведена в институте хирургии им. А.В. Вишневского МЗ и СР РФ, в Центральном научно-исследовательском институте стоматологии МЗ и СР РФ, Главном военном госпитале им. Н.Н. Бурденко Министерства обороны РФ, детской клинической больнице №1 г. Москвы (Морозовская) и на базе лечебных учреждений г. Иркутска (кафедры хирургии и детской хирургии РМА ПО, ОДКБ и другие хирургически стационары). Анализ эффективности клинического применения препарата Абисил проведен на 326 пациентах (220 взрослых в возрасте от 16 до 78 лет и 106 детей – от 3 до 14 лет), из них 39 больных стрептодермией, 12 – стрепто-стафилодермией 27 – с трофическими язвами, 21 – с ожоговыми ранами, 8 – с диабетическими флегмонами, 29 – с пиодермией (при чесотке), 18 – с отитом наружного и среднего уха, 38 – при лечении пародонта, 27 – при лечении абсцессов челюстно-лицевой области, 107 – с посттравматическими и послеоперационными ранами. Перед наложением повязки с Абисилом проводили тщательную ПХО раны. Препарат наносили на пораженную поверхность кожи равномерным слоем или смачивали марлевые салфетки, которые накладывали 1–2 раза в сутки.

Результаты и обсуждение

При изучении антимикробной активности препарата Абисил в отношении набора эталонных и клинических штаммов различных видов патогенных микробов установлено, что препарат подавляет рост большинства основных возбудителей хирургической инфекции (табл. 1).

Широкий спектр антимикробной активности Абисила по отношению к грамположительной и грамотрицательной микрофлоре может определять возможную его эффективность при применении в 1-й и 2-й фазе раневого процесса, что имеет определенное значение в местном лечении гнойных ран.

При анализе эффективности применения Абисила при лечении гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей различных локализаций установлено, что положительный клинический эффект колебался от 86,5 до 96,3 % в зависимости от группы больных.

Прежде всего, исчезали локальные признаки воспалительного процесса, снижались или исчезали болевые ощущения. Гиперемия и отек исчезали в среднем на 3–5 сутки.

Уменьшение и исчезновение гнойного отделяемого наблюдалось чаще всего через 3–6 суток лечения Абисилом. Уже на 3–5 сутки лечения отчетливо проявлялась кайма новообразованного эпи-

телия, причем, рост ее значительно опережал процесс разрастания грануляционной ткани. У большинства больных (67,7 %) длительность лечения гнойных ран не превышала 8 суток, у остальных больных продолжительность лечения гнойных ран составляла 10–16 и более суток, в основном у пациентов с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (сахарный диабет, гипертоническая болезнь и др.).

Высокий клинический эффект лечения гнойных ран препаратом Абисил хорошо коррелировал с данными бактериологических исследований, которые были выполнены у 103 больных с посттравматическими, послеоперационными и ожоговыми ранами (табл. 2).

Как видно из данных табл. 2, микрофлора до начала лечения Абисилом была представлена в основном грамположительными микроорганизмами, где преобладали стафилококки.

Грамотрицательная микрофлора была в основном представлена палочкой сине-зеленого гноя и другими неферментирующими бактериями. Уже на 3 сутки лечения из ран выделено 47 (45,6 %) штаммов микроорганизмов.

Через 5–7 суток лечения Абисилом микрофлора значительно снизилась и отмечалась только у единичных больных.

Общая противомикробная активность препарата Абисил составила 86,8 %. Необходимо отметить, что до начала лечения у 8 больных выделялись микробные ассоциации, исчезавшие уже на 3 и 5 сутки.

В 2 случаях наблюдалось присоединение грибковой флоры, что можно объяснить длительностью ранее проводимой общей и местной антибактериальной терапией.

В 3 случаях у больных отмечалось появление в ранах патогенной микрофлоры, отсутствующей до начала лечения, что указывало на реинфицирование ран.

При клиническом наблюдении отмечалась хорошая переносимость препарата Абисил при местном и наружном применении без аллергических и токсических проявлений.

Только шесть взрослых больных и двое детей отмечали кратковременное чувство жжения в ране сразу после нанесения препарата, которое прекращалось через 10–15 мин.

Выводы

Результаты клинического применения терпеноидсодержащего препарата Абисил при лечении гнойных ран, длительно незаживающих язв, ожогов и других гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей свидетельствуют о том, что препарат обладает многонаправленным действием, характеризующимся выраженным антимикробным, противовоспалительным, репаративным и анальгетическим эффектами.

Местное применение препарата предотвращает послеоперационные нагноения ран.

Использование препарата Абисил взамен профилактической антибактериальной терапии позволит снизить вероятность возникновения антибиотикоустойчивых штаммов патогенной микрофлоры и аллергии на организм.

Таким образом, анализ результатов проведенного исследования позволяет рекомендовать Абисил в качестве средства для лечения и профилактики хирургических инфекций, в том числе у онкологических больных.

Таблица 1

Спектр и степень антибактериальной активности препарата Абисил

Вид микроорганизмов	Разведения препарата	
	МПК	МБК
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	1 : 250	1 : 125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1 : 250	1 : 125
<i>Staphylococcus aureus</i> All types	1 : 64	1 : 16
<i>Staphylococcus aureus</i> 209p	1 : 1000	1 : 250
<i>Staphylococcus aureus</i> 94	1 : 64	1 : 32
<i>Staphylococcus aureus</i> 9197	1 : 32	1 : 16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	1 : 32	1 : 8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2124	1 : 16	1 : 8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1234	1 : 64	1 : 16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 601	1 : 32	1 : 8
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 883	1 : 32	1 : 16
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 308	1 : 64	1 : 16
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 654	1 : 16	1 : 4
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	1 : 64	1 : 16
<i>Streptococcus faecalis</i> 24/3	1 : 32	1 : 16
<i>Streptococcus faecalis</i> 9/3	1 : 16	1 : 2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1 : 500	1 : 250
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 5056	1 : 8	1 : 2
<i>Citrobacter freundii</i> 42/57	1 : 16	1 : 4
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	1 : 2	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1 : 2	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 58	1 : 4	1 : 2
<i>Escherichia coli</i> 27	1 : 4	1 : 2
<i>Serratia marcescens</i> 8200	1 : 2	1 : 2
<i>Providencia stuartii</i> 3646	1 : 2	–
<i>Proteus vulgaris</i> 32	1 : 4	1 : 2

Таблица 2

Динамика микрофлоры ран при лечении Абисилом

Микроорганизмы	n выделенных штаммов (абс, %)			
	Сроки наблюдения, дни			
	1	3	5	7
<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	43/41,7	16/15,5	7/6,8	5/4,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10/9,7	4/3,9	2/1,9	2/1,9
<i>Streptococcus</i>	1/0,9	–	–	–
<i>Enterococcus</i>	9/8,7	6/5,8	1/0,9	2/1,9
Грамположительные палочки	9/8,7	4/3,8	2/1,9	1/0,9
Неферментирующие грамотрицательные бактерии	8/7,7	4/3,8	2/1,9	2/1,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16/15,5	9/8,7	4/3,8	1/0,9
<i>Acinetobacter</i>	3/2,9	2/1,9	–	–
<i>Enterobacter</i>	4/3,8	2/1,9	–	1/0,9
Всего:	103/100	47/45,6	18/17,5	14/13,2

Литература

1. Гостищев В.К. Инфекции в хирургии: Руководство для врачей. – М.: Гэотар-Медиа, 2007. – 761 с.
2. Гуськова Т.А., Егоров А.М., Фисенко В.П. и др. Методические указания по изучению противомикробной активности фармакологических веществ: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 515–31.
3. Дмитриева Н.В. Антимикробная химиотерапия и профилактика инфекционных осложнений у онкологических больных: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1995. – 39 с.
4. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н., Смолянская А.З. Инфекционные осложнения в онкологической клинике // Практическая онкология. – 2001. – № 1(5). – С. 18–20.
5. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Применение Абисила при гнойной раневой инфекции (экспериментальные данные) // Актуальные проблемы клинической медицины: Материалы 11 региональной науч.-практ. конф. молодых ученых. – Иркутск, 1998. – С. 125–7.
6. Пинигина Н.М., Лацерус Л.А., Браин Э.В. и др. Средство «Абисил-1», обладающее противовоспалительной, антибактериальной и ранозаживляющей активностью // Патент РФ № 2054945 от 27.02.1996 г.
7. Рютин Н.П., Пинигина Н.М., Духанина А.В. Динамика формирования устойчивости бактерий к биологически активным веществам пихты сибирской // Бюллетень СО РАМН. – 1993. – №4. – С. 56–60.
8. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et al. Anticancer terpenoid pharmaceutical composition "Abisilin" with angiogenesisinhibition action.

(продолжение)

Если несколько рисунков идут под общей надписью, то сначала приводят ее, а затем названия отдельных рисунков под русскими буквами.

В подписях под рисунками должны быть объяснены все кривые, буквенные, цифровые и другие условные обозначения. В подписях под микрофотографиями следует указать методику микроскопии, увеличение, метод окраски материала.

Если иллюстрация заимствуется из другого источника, в конце подписи следует дать на него ссылку. На печатном экземпляре рисунки нумеруют, помечают верх и низ.

Все формулы должны быть тщательно выверены автором, набраны или встроены в формат текстового редактора.

В формулах необходимо различать строчные и прописные, латинские и греческие, подстрочные и надстрочные буквы. Используемые автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

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

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

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

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

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

(продолжение см. на стр. 48)

БИОТЕРАПИЯ

УДК 616-006.81:576.385.5:575

Т.В. Михайлова, М.А. Барышникова, О.С. Бурова, Л.Ф. Морозова, И.Н. Михайлова, А.Ю. Барышников
СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ HSP70 НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация

Михайлова Татьяна Витальевна, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

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

e-mail: tania-05@list.ru

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Уровень экспрессии белка теплового шока (heat shock protein) hsp70 имеет прогностическое значение в опухолях различного типа и используется для стимуляции иммунного ответа при вакцинотерапии злокачественных новообразований.

Экспрессию hsp70 определяли на 15 клеточных линиях меланомы после замораживания и прогревания. Определение уровня экспрессии проводили методом иммуноблоттинга.

Уровень hsp70 в лизатах клеток, подвергшихся прогреванию, резко отличался от уровня белка в клетках, подвергшихся замораживанию. Установлено, что экспрессия hsp70 не зависит от экспрессии молекул HLA I и II классов. Высокий уровень экспрессии hsp70, выявленный в лизатах клеточных линий после заморозки, может быть применен впоследствии при вакцинации пациентов с меланомой.

Ключевые слова: hsp70, клеточные линии меланомы, иммуногенность.

T.V. Mikhailova, M.A. Baryshnikova, O.S. Burova, L.F. Morozova, I.N. Mikhailova, A.Yu. Baryshnikov
EXPRESSION OF HSP70 IN MELANOMA CELL LINES
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

Abstract

Expression of hsp70 is of prognostic significance in several tumor types and use as a marker of immune response in tumor vaccination.

In this study, expression of hsp70 was determined in 15 melanoma cell lines. We have followed the expression of hsp70 in melanoma cells after freezing and heating. Expression of hsp70 was validated by Western blot analysis.

There was a significant difference in protein level of hsp70 between melanomas cell lines and after heating/freezing.

It has been also established that expression of hsp70 was not correlated with the expression of HLA. The high expression of hsp70 in cells after freezing indicates that this protein might be a potential vector in melanoma vaccination.

Key words: hsp70, melanoma cell lines, immunotherapy.

Введение

Меланома кожи еще 30–40 лет назад была сравнительно редкой патологией в большинстве стран мира. Однако за истекшее время частота ее возникновения значительно увеличилась и продолжает неуклонно возрастать. Среднегодовой темп прироста заболеваемости этой опухолью в мире составляет около 5 % (в США – 4 %, в России – 3,9 %) и может считаться одним из самых высоких среди всех злокачественных опухолей, кроме рака легкого.

Меланома считается «антигенной опухолью», экспрессирующей так называемые опухолеассоциированные антигены. Эти антигены используются при вакцинотерапии, которая является одним из иммунологических подходов в лечении онкологических заболеваний [3].

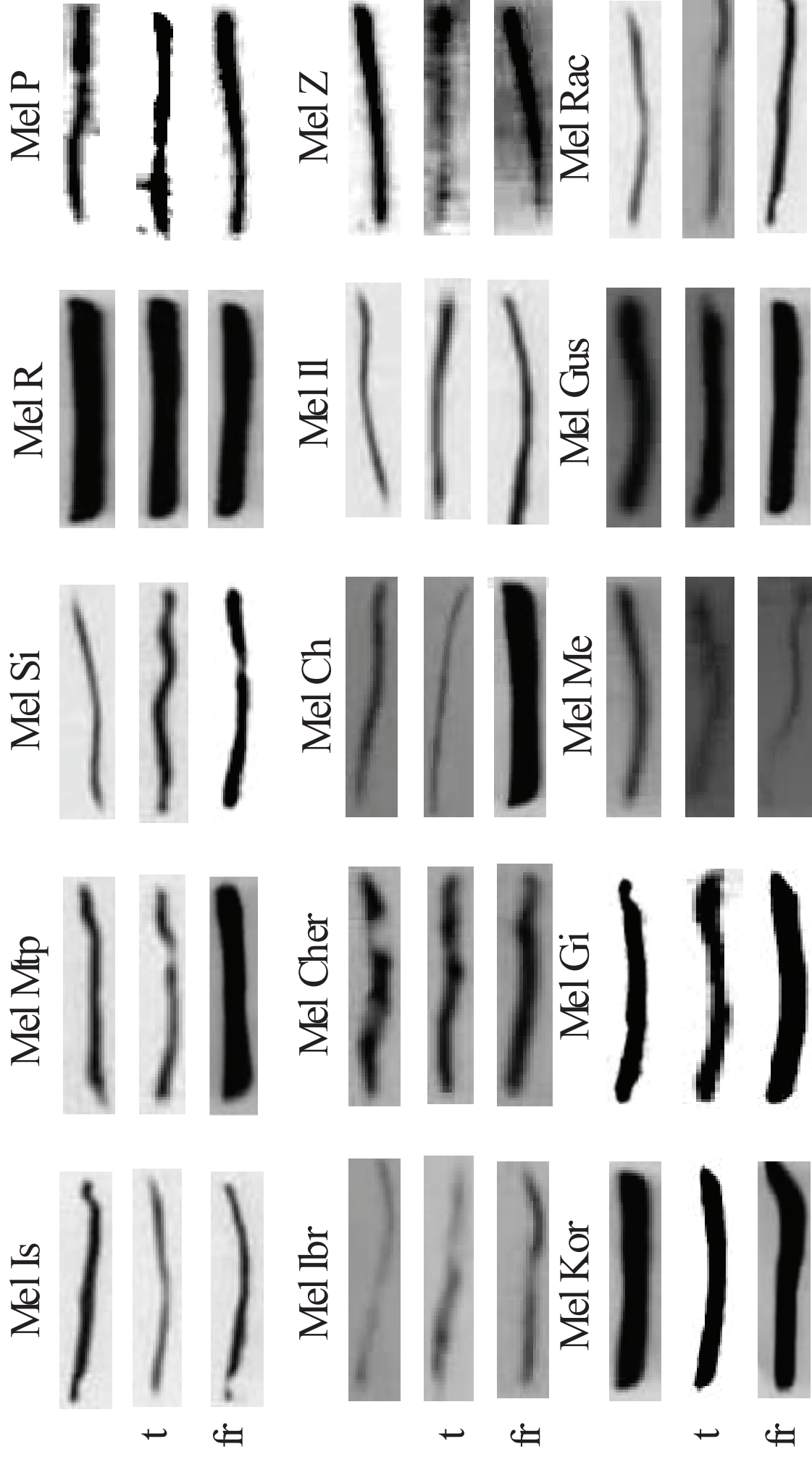
В процессе поиска опухолеспецифических антигенов было установлено, что белки теплового шока обладают высокой иммуногенной активностью.

Наиболее широко распространены и лучше изучены hsp с молекулярным весом 70 кДа. Представители этого семейства участвуют во многих внутриклеточных процессах. Действуя как молекулярные шапероны, они способствуют образованию мультибелковых комплексов, принимающих участие в транслокации полипептидов через клеточную мембрану в ядро, а также обеспечивают правильное сворачивание полипептидной цепи. Недавно было установлено, что экстрацеллюлярно-локализованные hsp 70 играют ключевую роль в индуцировании клеточного иммунного ответа [4; 5].

При многих злокачественных новообразованиях hsp высоко экспрессируются и участвуют в пролиферации, дифференцировке, метастазировании и узнавании опухолевых клеток иммунной системой. Они являются важными биомаркерами канцерогенеза в некоторых тканях и сигнализируют о степени дифференцировки и агрессивности некоторых видов рака [2].

Уровень экспрессии hsp70 в сравнении с экспрессией других антигенов на клеточных линиях меланомы

Степень дифференцировки опухолевых клеток	Название линии	Hsp-70, %	HLA-ABC, %	HLA-DR, %	MelanA	HMB-45	Typ										
Высокая	Mel Si	5,29	99,5	96,0	neg	pos	pos										
	Mel Si t*	11,98															
	Mel Si fr**	16,47															
	Mel Me	20,04															
	Mel Me t	24,76															
	Mel Me fr	16,56															
Умеренная	Mel R	9,62	83,7	1,4	neg	neg	neg										
	Mel R t	7,97															
	Mel R fr	8,82															
	Mel P	8,00															
	Mel P t	8,81															
	Mel P fr	10,24															
	Mel II	6,78						93	2,3	neg	pos	neg					
	Mel II t	7,29															
	Mel II fr	9,69															
	Mel Z	13,81															
	Mel Z t	5,92															
	Mel Z fr	14,58															
	Mel Mtp	9,00											99,7	5,1	pos	pos	pos
	Mel Mtp t	6,39															
	Mel Mtp fr	19,73															
Mel Kor	5,13																
Mel Kor t	6,32																
Mel Kor fr	8,42																
Mel Ibr	5,13	99,1	63,3	neg	neg	neg											
Mel Ibr t	5,25																
Mel Ibr fr	5,39																
Mel Is	15,17																
Mel Is t	4,76																
Mel Is fr	11,12																
Mel Ch	5,46						99,5	47,2	neg	neg	neg						
Mel Ch t	3,72																
Mel Ch fr	5,96																
Mel Cher	9,6																
Mel Cher t	9,09																
Mel Cher fr	9,83																
Mel Gi	7,56											98,1	61,0	neg	pos	pos	
Mel Gi t	9,07																
Mel Gi fr	12,38																
Mel Gus	8,38																
Mel Gus t	8,44																
Mel Gus fr	9,09																
Mel Rac	6,24	97,9	90,0	pos	pos	neg											
Mel Rac t	6,27																
Mel Rac fr	8,34																
*t – клетки, прогретые при температуре 42 °С на водяной бане в течение 10 мин; **fr – клетки после заморозки при температуре –80 °С.																	



Анализ экспрессии белка hsp70 в лизатах клеточных линий меланомы человека методом иммуноблоттинга.

Экспрессия hsp индуцируется не только при повышении температуры, но и при других таких стрессовых воздействиях, как замораживание, окислительный стресс, отравление тяжелыми металлами, алкоголем [7].

Способность белков теплового шока связывать пептиды-антигены легла в основу иммунотерапевтического подхода к лечению онкозаболеваний. Белки теплового шока, кроме проявления шапероновой активности к опухолевым пептидным антигенам, облегчают входение в клетки hsp-пептидных комплексов за счет рецепторного эндоцитоза. Эта способность hsp позволила достаточно быстро перейти от изучения hsp-вакцин на моделях животных к лечению раковых заболеваний в клинике. Раньше для вакцинации использовались выделенные из опухолей онкологических больных пептидные комплексы hsp70 и Grp96, затем эффективность hsp-вакцин удалось увеличить при выделении hsp70 из гибридов дендритных клеток с опухолевыми [8].

Как шапероны hsp проявляют антигенпрезентирующую функцию путем связывания антигенов. Цитоплазматические изоформы hsp70 и hsp90 способны связывать антигенные белки и доставлять их в эндоплазматический ретикулум. Известно, что антигены связываются с молекулами HLA I класса при воздействии гликопротеина GP96 (GRP94) – эндоплазматической изоформы hsp90. Белки теплового шока взаимодействуют с антигенпрезентирующими клетками через CD91 и другие рецепторы, инициируя каскад событий, включающих презентацию hsp-шаперонных пептидов главному комплексу гистосовместимости [1; 6; 13].

Целью настоящей работы явилось сравнение уровня экспрессии hsp70 на клеточных линиях меланомы для последующего отбора линий с высокой экспрессией как потенциально иммуногенных.

Материалы и методы

Препараты и реактивы

- Акриламид/бис-акриламид 30 %-ный p-p (Sigma);
- Электродный буфер – 10×Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad);
- буфер для переноса – 10×Tris/Glycine buffer (Bio-Rad);
- натрия додецил сульфат (SDS) (Bio-Rad);
- краситель Bromophenol Blue Sodium salt (Helicon);
- аммония персульфат (Helicon);
- ТЕМЕД (Helicon);
- фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (ПанЭко);
- 2-меркаптоэтанол (Helicon);
- неионогенный детергент Triton X-100 (Bio-Rad).

Приборы

- Прибор для анализа гелей Syngene;
- спектрофотометр Beckman coulter DU 800;
- центрифуга Eppendorf centrifuge 5417 R;
- шейкер Biosan PSU –2Т;
- вортекс Heidolph Reax top;
- камера для электрофореза и иммуноблота Bio-Rad Power Pac HC (Bio-Rad).

Получение лизатов клеточных линий

Клетки линий меланомы *mel P*, *mel Kor*, *mel Mip*, *mel Il*, *mel Is*, *mel Si*, *mel Me*, *mel Gus*, *mel Z*, *mel Gi*, *mel Ibr*, *mel R*, *mel Rac*, *mel Ch*, *Mel Cher* из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН культивировали в полной питательной среде RPMI 1640 с 10%-ной телячьей эмбриональной сывороткой. Далее клетки подвергали тепловому воздействию при

42 °С в течение 10 мин на водяной бане, после чего выдерживали в CO₂-инкубаторе 30 мин. В работе также использовались клетки после заморозки. Для получения опухолевого лизата в суспензию, содержащую 5 млн клеток, поочередно добавляли лизирующий буфер (буфер А) в количестве 300 мкл.

Состав буфера А:

- 50 мМ трис1 (гидроксиметил) аминотетан (Helicon),
- 120мМ NaCl,
- 1 мМ дитиотреитол (Fluka),
- 0,5 %-ный неионогенный детергент NP-40 (Sigma),
- 1 мМ ЭДТА (Helicon),
- 0,25 %-ный натрия дезоксихолат (Sigma),
- коктейль ингибиторов протеаз PIC (Roche).

Затем выдерживали во льду 30 мин. Разрушенные клетки осаждали центрифугированием (20 мин при 2000 g). Супернатант отбирали и использовали для постановки электрофореза по стандартной методике [12]. Анализируемые белки растворяли в буфере для проб Laemmli Sample buffer (Bio-Rad), на каждую дорожку наносили 20 мкг белка. После окончания электрофореза гель извлекали и использовали для переноса на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma).

Иммуноблотинг

Нитроцеллюлозную мембрану с перенесенными белками инкубировали при комнатной температуре в течение часа с 5 %-ным раствором сухого молока Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad) для блокирования неспецифического связывания в буфере Б, состоящем из 2М трис, 0,5 М ЭДТА, 5М NaCl, 0,1 %-ного реагента Tween 20 (Bio-Rad). Затем мембрану дважды отмывали по 10 мин в 20 мл буфера Б. Далее проводили инкубацию с антителами Mouse anti-heat shock Protein 70 Monoclonal Ig G (Ab-frontier), разведенными в соотношении 1: 2000 в буфере Б в течение 90 мин. После этого мембрану отмывали дважды по 15 мин в буфере Б.

Инкубацию с антителами Blotting Grade Affinity Purified Goat Anti Mouse Ig G Alkaline Phosphatase conjugate (Bio-Rad), разведенными в соотношении 1:3000 в буфере Б, проводили в течение 90 мин. Затем мембрану отмывали дважды по 15 мин в буфере Б.

Мембрану детектировали с помощью красителя 1 Step NBT/BCIP (Thermo scientific). Результат и степень интенсивности окраски полос фиксировали на приборе Syngene с помощью программы Gene tools (см. рисунок).

Результаты и обсуждение

Экспрессия hsp70

в клетках меланомы человека

На начальной стадии работы мы определяли методом иммуноблоттинга уровень экспрессии hsp70 в лизатах клеток меланомы, полученных из опухолевого материала больных диссеминированной меланомой и выведенных в клеточную линию в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Во всех 15 анализируемых клеточных линиях меланомы был обнаружен белок с молекулярной массой 70 кДа, соответствующий полноразмерному белку hsp70.

Однако количество его варьировало как в различных клеточных линиях, так и в зависимости от предварительной обработки клеток.

Сравнивали уровень экспрессии hsp70 с экспрессией антигенов гистосовместимости I (HLA-ABC) и II (HLA-DR) классов. Экспрессию HLA-ABC и HLA-DR ранее определяли в нашей лаборатории на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson), используя антитела фирмы Serotec. HLA I и II классов экспрессируются на клетках различных типов и разной степени дифференцировки [11].

Был проведен анализ корреляции экспрессии hsp70 с дифференцировочными, тканеспецифичными и неопухолеассоциированными антигенами меланомы (MelanA, HMB-45, Туг) и др., экспрессию которых определяли ранее в нашей лаборатории иммуноцитохимическими методами. Количественный анализ экспрессии hsp70 в сравнении с уровнем экспрессии HLA-ABC, HLA-DR и других антигенов на клеточных линиях меланомы представлен в таблице.

Так, самое низкое содержание hsp70 обнаружено на линиях Mel Si, Mel Kor, Mel Ibr, Mel Ch. Высокое содержание hsp70 зафиксировано на линиях Mel Me, Mel Is, Mel Z. Высокий уровень экспрессии hsp70 в клетках после прогревания наблюдали на клеточных линиях Mel Me, Mel Si. Наибольшее количество hsp70 в клетках, подвергнутых заморозке, обнаружили на линиях Mel Si, Mel Mtp, Mel Is, Mel Gi, Mel Me, Mel Z.

Полученные данные указывают на то, что в наших экспериментах наиболее высокий уровень экспрессии hsp70 имеют клетки после предварительной заморозки.

Низкое содержание hsp70 в клетках после прогревания по сравнению с интактными клетками и клетками после заморозки говорит о том, что температуру и время прогревания необходимо корректировать.

Так, по некоторым данным [9], клетки меланомы прогревали при температуре 38,5 °С в течение 1 ч, после чего лизировали. В другой работе [10] клетки меланомы прогревали при 42 °С в течение 60 мин, после чего инкубировали 24 ч и затем лизировали. Используя эти данные, мы изменяли температуру и время прогревания, но наибольшее количество hsp70 было зафиксировано при прогревании при 42 °С в течение 10 мин и последующем лизисе через 30 мин. Практически не изменялся уровень экспрессии в клетках после прогревания по сравнению с непрогретыми клетками на клеточных линиях Mel R, Mel Kor, Mel Ibr, Mel Cher, Mel P, Mel Gus, Mel Rac. Эти результаты могут указывать на то, что клетки этих линий слабо реагируют на прогревание. Подобный результат был получен на устойчивой к прогреванию клеточной линии меланомы B16 [14].

Выводы

1. На основании полученных результатов установлено, что исследованные нами клеточные линии меланомы различаются по уровню экспрессии hsp70.
2. Интенсивность экспрессии hsp70 меняется в зависимости от типа воздействия. Мы предполагаем, что потенциально более перспективным для создания стимуляторов иммунного ответа больных меланомой кожи будет использование клеток линий Mel Si, Mel Mtp, Mel Is, Mel Z после предварительной заморозки.
3. Интенсивность экспрессии hsp70 меняется в зависимости от времени воздействия на клетки.
4. Уровень hsp70 не зависит от экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-ABC и HLA-DR.

Авторы статьи выражают благодарность кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей Вартамян А.А. за помощь в работе.

Литература

1. Бережной А.Е., Закеева И.Р., Барышников А.Ю. и др. Анализ экспрессии молекул HLA-E в клетках меланомы человека // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2006. – №3. – С. 66–71.
2. Гужова И.В. Механизмы работы шаперона hsp70 в нормальных клетках и при клеточной патологии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб, 2004. – 40 с.
3. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2005. – Т.7 – С.37–40.
4. Фаллер Д.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Пер. с англ. – М.: Бинном-Пресс, 2004. – С. 69.
5. Basu S., Binder R.J., Ramalingam T., Srivastava P.K. Heat shock proteins as novel mediators of cytokine secretion by macrophages // Cell Stress Chaperones. – 1998. – Vol. 3. – P. 11.
6. Boon T., Pierre C., Benoit J. et al. Human T-Cell Responses Against Melanoma // Annu. Rev. Immunol. – 2006. – 24(6). – P. 1–6.34.
7. Blachere N., Li Z., Chandawarcar R. et al. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity // J. Exp. Med. – 1997. – Vol. 186. – P. 1315–22.
8. Craig E.A., Gross C.A. Is HSP70 the cellular thermometer? // Trends Biochem. Science. – 1991. – Vol. 16. – P. 135–40.
9. He L., Guan K., Ye H. Heat shock protein 70 expression in relation to apoptosis in primary bladder transitional cell carcinoma // Chinese Med. J. – 2005. – Vol. 118(24). – P. 2093–6.
10. Ferrini U., Falcioni R., Delpino A. et al. Heat-shock proteins produced by two human melanoma cell lines: Absence of correlation with thermosensitivity // Int. J. of Cancer. – 2006. – Vol. 34. – P. 651–5.
11. Seliger B., Ritz U., Ferron S. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation // Int. J. Cancer. – 2006. – Vol. 118. – P. 129–38.
12. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989. – P. 1847–75.
13. Suzue K., Zhou X., Eisen H.N., Young R.A. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into major histocompatibility complex class I presentation pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1997. – Vol. 94. – P. 13146–51.
14. Anderson R.L., Tao T.W., Betten D.A., Hahn G.M. Heat shock protein levels are not elevated in heat-resistant B16 melanoma cells // Radiat. Res. – 1986. – Vol. 105. – P. 240–6.

(продолжение)

Руководство по гематологии под ред. А.И. Воробьева. – Т. 2. – М.: Ньюдиамед, 2004. – 277 с.

Bihrl R., Libertino J.A. Renal cell cancer with extension into the vena cava. In: Dekernion B.J., Pavone-Macaluso M. eds., Tumors of kidney. – Baltimore: Williams&Wilkins, 1986. – P. 111–123.

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

Кэйн Д. Этические и правовые основы медицинской помощи. Берек Д., Адаши И., Хиллард П. (ред.). Гинекология по Эмилю Новаку: Пер. с англ. – М.: Практика, 2002. – С. 14-18.

При ссылке на журнал указывают авторов, затем название статьи, названию периодического издания или сборника предшествует символ // . После названия журнала указывается год, том, номер выпуска, первая и последняя страницы работы, например:

Поддубная И. В., Дёмина Е. А. Диагностика и определение распространенности (стадирование) неходжкинских лимфом // Практическая онкология. – 2004. – № 3. – С. 176–184.

При ссылке на сборник статей указывают авторов, затем название статьи, сборника, место издания, год, страницы, например:

Коненко Г. А. Решение уравнений движения однофазного вязкого закрученного потока в длинной трубе. Отопление и вентиляция. – Иркутск, 1994. – С. 34–36.

При ссылке на тезисы докладов указывают авторов, затем название тезисов конференции, страницы. При ссылке на диссертации или авторефераты указывают автора, затем название диссертации, место и дату написания, страницы.

При этом используются следующие сокращения: Дис... канд. мед. наук, Дис... д-ра мед. наук, Авторефер. дис... канд. мед. наук, Авторефер. дис... д-ра мед. наук. Ссылки на интернет-документы следует оформлять так:

Официальные периодические издания: электронный путеводитель / Рос. нац. б-ка, Центр правовой информации. [СПб.], 2005 – 2007. URL: <http://www.nlr.ru/lawcenter/izd/index.html> (дата обращения: 18.01.2007).

(окончание см. на стр. 68)

УДК 616.006-441-08-059-092.9:611.13/.16.018:577.21.088

Д.В. Соколова, Е.В. Степанова, В.А. Голубева, Е.М. Трещалина, А.Ю. Барышников

ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КСЕНОГРАФТОВ ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА ЛБР-2 КАК МИШЕНИ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация

Соколова Дарина Вадимовна, аспирант, лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

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

e-mail: d.v.sokolova@gmail.com

Статья поступила: 26.02.2010, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

Лиганд-опосредованная доставка липосомальных форм противоопухолевых препаратов к антигенам является эффективной стратегией, направленной на повышение их терапевтической эффективности. В качестве антигена-мишени выступают, как правило, молекулы, гиперэкспрессированные или селективно представленные на поверхности опухолевых клеток. Для определения дозового диапазона биологического действия подобных препаратов необходимы адекватные модели на животных. В настоящей работе с помощью морфологического, иммуногистохимического и проточно-цитофлуориметрического методов исследования определены основные биологические мишени для противоопухолевой таргетной терапии в подкожных ксенографтах лимфомы Беркитта человека, штамм ЛБР-2 из Коллекции опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Установлено наличие на поверхности клеток ЛБР-2 антигенов-мишеней CD19 и HLA-DR, а также маркеров неоплазии VEGF, HIF1 α , CD31 и маркера пролиферации Ki-67. Стабильный уровень экспрессии CD19 и HLA-DR антигенов позволяет рекомендовать эту опухоль в качестве доклинической модели для изучения специфической противоопухолевой активности препаратов, направленных против этих мишеней.

Ключевые слова: таргетная терапия опухолей, молекулярные мишени, маркеры неоплазии, подкожные ксенографты лимфомы Беркитта человека ЛБР-2, иммунодефицитные мыши, морфология опухоли, иммунология опухоли.

D.V. Sokolova, E.V. Stepanova, V.A. Golubeva, E.M. Treshalina, A.Yu. Baryshnikov

THE BASIC BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HUMAN LYMPHOMA LBR-2 XENOGRAFT FOR TARGETED THERAPY

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

Abstract

Ligand-mediated delivery of liposomal anticancer drugs to antigens is being recognized as an effective strategy for increasing the therapeutic effectiveness of anticancer drugs. Molecules that are either presented selectively, or are overexpressed on the tumor cells surface are usually used as target antigens. To determine the dose range of biological effects for these drugs, the adequate animal models are required. In this study we performed morphological, immunohistochemical and flow-cytometry methods to identify the major biological target for anticancer «target» therapy in subcutaneous human lymphoma xenografts line LBR-2 from the N.N. Blokhin Cancer Research Center Collection of tumor strains. We have determined the expression of CD19, CD20, and HLA-DR antigens as well as the markers of neoangiogenesis VEGF, HIF-1 α , CD31, and the proliferation marker Ki-67 on the LBR-2 cells. The constitutive expression of CD19 or HLA-DR antigens make it possible to recommend this tumor as a preclinical model to examine the specific antitumor activity of drugs directed against these targets.

Key words: targeted tumor therapy, molecular targets, markers of neoangiogenesis, subcutaneous xenografts of Burkitt's human lymphoma line LBR-2, immune deficient mice, tumor morphology, tumor immunology.

Введение

Агрессивные неходжкинские лимфомы представляют собой группу опухолей, характеризующихся высоким уровнем пролиферативной активности и умеренной или высокой чувствительностью к химиотерапии. Применение цитостатиков в составе традиционных схем ХТ для лечения этого заболевания ограничено высокой общей токсичностью [2; 4; 7]. Молекулярная идентификация опухолевых маркеров открыла новые возможности для развития эффективной селективной стратегии, основанной на использовании лиганд-опосредованного или т.н. «активного» транспорта препаратов к опухоли [10; 12]. Данная стратегия реализовалась, в частности, в

разработке иммунолипосомальных лекарственных форм, содержащих на поверхности липосомы в качестве лиганда специфическое антитело или его Fab-фрагмент к одному из опухолевых антигенов [5; 6; 9; 11]. Для определения дозовых характеристик антипролиферативного действия адресных форм противоопухолевых препаратов, перспективных для клинического изучения, необходимо использовать адекватные модели опухолевого роста на животных [8; 13–15]. Оптимальной опухолевой моделью для оценки активности иммунолипосомального лекарственного препарата *in vivo* является человеческая опухолевая клеточная линия гистологически идентичная исходной опухоли, адаптированная к росту у иммунодефицитных животных.

Помимо этого такая модель должна иметь адекватные кинетические параметры (скорость роста, достаточно длительную фазу экспоненциального роста, образование измеряемых опухолевых узлов и т.д.), а также способность к неоваскуляризации для обеспечения эффективной доставки препарата к мишени. В качестве специфических характеристик на поверхности опухолевых клеток обязательна стабильная селективная гиперэкспрессия сигнальных антигенов, к которым специфичны МКА, конъюгированные с липосомами [12]. Данная работа посвящена изучению штамма человеческой лимфомы Беркитта ЛБР-2 из Коллекции опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН [4] с помощью гистологической, морфологической и иммунологической идентификации основных молекулярных мишеней для рекомендации использования ее в качестве опухолевой модели при доклинической оценке эффективности «таргетных» препаратов. Стабильно экспрессируемые мишени рассматривались как основание для использования этой модели в доклинических исследованиях.

Материалы и методы

Лабораторные животные

Использовали 90 конвенциональных мышей-самок Balb/c nude 8–10 нед массой тела 18–21 г. Мышей содержали в SPF-зоне специализированного кондиционированного бестимусного отсека 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).

Штамм опухоли

Использован штамм лимфомы Беркитта ЛБР-2, первично полученный на мышцах Balb/c nude в виде п/к ксенографтов из культуры клеток линии Namalwa [3], и затем специально адаптированный нами к росту в культуре клеток.

Для получения 1-го пассажа на мышцах адаптированную нами культуру клеток ЛБР-2 имплантировали п/к в количестве 5×10^6 клеток на мышь. Повторные пассажи выполняли взвесью опухолевой ткани (инокулят), полученной из подкожных узлов предшествующего пассажа по 60 мг на мышь в 0,5 мл питательной среды 199. Для получения взвеси опухоль препарировали, измельчали с помощью медицинских ножниц, филь-тровали полученную взвесь от крупных агрегатов и *ex tempore* готовили инокулят. Всего выполнено 10 пассажей с интервалом 23 дня между трансплантациями.

Таким путем достигалась возможность получения достаточного количества опухолевого материала для необходимых исследований с использованием одного культурального пассажа.

Определение основных биологических характеристик ЛБР-2

В эксперименте выполняли:

- мониторинг кинетики роста опухоли под кожей мышей;
- гистологическое исследование строения опухолевого узла (морфологический контроль);
- иммунофенотипическое исследование основных опухолевых маркеров *in vivo*;
- определение основных маркеров неоангиогенеза *in vivo*.

Мониторинг роста п/к ксенографтов на мышцах

Для выявления п/к опухолевых узлов у мышей проводили визуальное наблюдение, а также периодическую пальпацию места трансплантации и наблюдение за характером роста в течение не менее месяца после трансплантации. 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 последующего объема к предыдущему:

$$\frac{V_n}{V_{n-1}}, \text{ где}$$

n – номер измерения.

По этим параметрам строили кривые и определяли стандартные показатели роста опухоли: длительность латентного периода (отсутствие пальпируемых опухолей), экспоненциальной фазы (\geq трехкратное увеличение размеров), стационарной фазы (отсутствие динамики роста, или менее чем трехкратное увеличение размеров). Параметры роста считали стандартными при условии 100 % прививаемости пассажа. Дополнительным показателем стандартности являлась продолжительность жизни мышей с опухолью, соответствующая паспортным данным коллекционного штамма.

Морфологическое исследование

Для морфологического исследования выделенный опухолевый материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине в течение 24–48 ч. Затем промывали в проточной водопроводной воде, фиксировали в 5 сменах этанола в течение 1–2 ч в каждой, в 2 сменах ксилола по 20 мин в каждой и в смеси ксилोल/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.

Имунофенотипическое исследование

Опухолевый материал, полученный от каждого пассажа, типировали с помощью реакции поверхностной иммунофлуоресценции. В исследовании использовалась следующая панель МКА: HLA-ABC (Serotec), HLA-DR (Serotec), CD20 (Serotec), ICO-180 (НПЦ «Медбиоспектр»), CD19 (Serotec), CD45 (Serotec), изотипические контроли, конъюгированные с FITC и PE (Beckman Coulter). С целью определения степени чистоты полученной опухолевой суспензии проводили двойное окрашивание клеток МКА к молекулам МНС I класса HLA-ABC и общелейкоцитарному АГ CD45. Клетки дважды отмывали и ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (PBS), pH 7,4. Клетки ($0,5\text{--}1 \times 10^6$) инкубировали с МКА в течение 30 мин в темноте при 4 °С. После этого клетки дважды отмывали и ресуспендировали в PBS, содержащем 1% формалина. Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Имуногистохимическое исследование

Проводили с помощью ИГХ-анализа срезов парафиновых блоков опухолей. Ангиогенную активность опухоли определяли как по экспрессии белков, запускающих процесс ангиогенеза HIF-1 α и VEGF, так и по количеству микрососудов в опухоли, что является суммарным показателем действия стимуляторов и ингибиторов ангиогенеза.

Срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов проводили прогревание срезов в предварительно нагретом до 95–99 °С в 10 мМ цитратном буфере в течение 30 мин.

Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 10 мин в темноте с 3 %-ной перекисью водорода. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 мин с 1 %-ным раствором бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию с первичными антителами проводили при 4 °С в течение 16 ч. Инкубацию с провяочной тест-системой [LSAB®+kit 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 [ДАКО]. 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 $\times 10$, $\times 40$. Для маркеров VEGF и HIF-1 α оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана) и интенсивность иммунного окрашивания.

Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Опухоль считали положительной по VEGF, если в ткани опухоли наблюдалось значимое окрашивание цитоплазмы более 25 % опухолевых клеток. Для оценки пролиферативной активности опухоли подсчитывали количество Ki-67⁺ опухолевых клеток, приходящиеся на 200–300 опухолевых клеток. Индекс Ki-67 определяли по формуле:

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

ПА – пролиферативная активность опухоли.

Количество сосудов, окрашенных антителами к CD31, оценивали не менее чем в 3 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 ЛБР-2 in vivo

На 1-м пассаже выполняли трансплантацию клеток в стандартной прививочной дозе 5×10^6 клеток на мышь. К 18 дню (латентный период) после трансплантации получен 100 %-ный выход опухолей среднего объема $V_{ср} = 336[198; 474] \text{ мм}^3$.

К 22-му дню объем увеличился в 5,1 раза до $V_{ср} = 1734[1312; 2156] \text{ мм}^3$ с постоянной скоростью к 26 дню опыта. Экспоненциальная фаза роста, таким образом, составила 8 дней (рис. 1). Стационарную фазу роста с увеличением объема опухоли в 1,2 раза наблюдали на 26–30 дни опыта.

В результате к концу наблюдения объем опухолей увеличился почти в 18 раз и достиг $V_{ср} = 5655[4311; 6999] \text{ мм}^3$ (рис. 2).

Гистологическая характеристика п/к ксенографтов ЛБР-2 у мышей-самок Balb/c nude

Во всех гистологических препаратах, полученных из опухолевых узлов 1–10-го пассажей выявлен диффузный рост относительно мономорфных мелких клеток полигональной формы с круглым или овальным ядром, по размерам превышающим ядро малого лимфоцита (рис. 3 А, Б). Ядерная мембрана четкая. В ядре определяются множественные (2–5) базофильные нуклеолы. Характерны многочисленные фигуры митоза. Выявляется высокий уровень пролиферативной активности (индекс Ki-67 приближен к 100 %; рис. 4). Присутствует типичная для данного типа лимфомы картина «звездного неба» («*starry sky*»), обусловленная присутствием большого числа макрофагов. Выявленная при патоморфологическом исследовании структура полученных нами п/к ксенографтов ЛБР-2 идентична гистологической картине лимфомы Беркитта человека [1].

Иммунофенотипическая характеристика ЛБР-2

В культуре клеток ЛБР-2 выявлен высокий уровень экспрессии молекул МНС I класса 95 ± 3 % (рис. 5 А), В-клеточных антигенов CD19 (92 ± 5 %; рис. 5 Б), CD20 (93 ± 2 %; рис. 5 В), а также молекул МНС II класса HLA-DR (92 ± 3 %; рис. 5 Г).

В результате иммунофенотипического исследования п/к ксенографтов ЛБР-2 1–10 пассажей при двойном окрашивании с использованием МКА CD45 и HLA-ABC выявлено 94 ± 2 % позитивных клеток (рис. 6), что свидетельствует о чистоте опухолевого инокулята. Уровень экспрессии В-клеточного маркера CD19 на 1 пассаже п/к ксенографтов ЛБР-2 был относительно низок по сравнению с исходным на клеточной линии и составил 37 ± 3 % (рис. 7 А). Ко 2 пассажу экспрессия антигена снизилась до 12 % (рис. 7, Б), к 4 – снизилась практически до нуля (рис. 7 Г). Начиная с 5 пассажа, экспрессия маркера CD19 начала восстанавливаться и к 6 пассажу достигла исходного уровня (рис. 7 Е). Экспрессия антигена CD20 полностью утрачивалась уже на 1 пассаже и не восстанавливалась на последующих (рис. 8 А–Г). Потеря экспрессии В-клеточного антигена может быть обусловлена относительно слабым иммунодефицитом гибридных животных.

Уровень экспрессии молекул МНС II класса (HLA-DR) был стабильно высоким на протяжении всего периода пассирования (рис. 9).

Определение ангиогенной активности п/к ксенографтов ЛБР-2

Исследование показало, что на поверхности опухолевых клеток ЛБР-2 разных пассажей значимых различий в накоплении HIF1- α нет. Напротив, в цитоплазме и ядре опухолевых клеток наблюдалось накопление HIF1- α в 80–100 % клеток – соответствующее окрашивание (рис. 10 Б). Интенсивность окрашивания антителами к HIF1- α была выше в центральной части, чем в периферических участках опухоли. Экспрессия основного фактора ангиогенеза VEGF наблюдалась в цитоплазме 60–80 % опухолевых клеток, интенсивность окрашивания и количество положительных клеток значимо не изменялись на протяжении всего периода пассирования (рис. 10 В).

Иллюстрации 1–10 см. на стр. II–IV

Среднее количество микрососудов в опухоли, окрашенных антителами к CD31, составило 6 ± 3 в поле зрения при увеличении $\times 40$ (рис. 10 А) и значимо не изменялось от пассажа к пассажи.

Таким образом, стабильно высокая экспрессия факторов неоплазии в п/к ксенографтах ЛБР-2 на протяжении 10 пассажей указывает на высокую ангиогенную активность этой опухолевой модели.

Выводы

1. Штамм перевиваемой лимфомы Беркитта человека ЛБР-2 из Коллекции опухолевых штаммов РОНЦ адаптирован к росту *in vitro*.
2. П/к ксенографты ЛБР-2 полученные имплантацией адаптированной культуры клеток иммунодефицитным мышам Balb/c nude, по прививаемости, скорости, кинетике роста и размерам опухолевых узлов пригодны для доклинических исследований.
3. П/к ксенографты ЛБР-2, первично полученные из культуры клеток линии Namalva, при многократном пассировании на иммунодефицитных мышках-самках Balb/c nude сохраняют гистологическую структуру, идентичную лимфоме Беркитта человека.
4. П/к ксенографты ЛБР-2 в течение 10 пассажей на мышках Balb/c nude имеют стабильно высокий уровень экспрессии молекул HLA-DR.
5. Стабильная экспрессия В-клеточного маркера CD19 в п/к ксенографтах ЛБР-2 на мышках Balb/c nude устанавливается только после 5-го пассажа.
6. Экспрессия В-клеточного маркера антигена CD20 в п/к ксенографтах ЛБР-2 не выявляется ни в одном из пассажей на мышках Balb/c nude.
7. ЛБР-2 в виде п/к ксенографтов обладает высоким уровнем экспрессии ангиогенных маркеров VEGF; CD31; HIF1- и могут быть использованы для доклинического изучения противоопухолевых препаратов, направленных на ингибирование ангио- и васкулогенеза.
8. Штамм лимфомы Беркитта человека ЛБР-2 из Коллекции опухолевых штаммов РОНЦ в виде п/к ксенографтов пригодна для оценки антипролиферативного действия адресных препаратов, направленных против HLA-DR и/или CD19 антигена.

Литература

1. Е.А. Барях, С.К. Кравченко, Т.Н. Обухова и др. Лимфома Беркитта: клиника, диагностика, лечение // Клиническая онкогематология. – 2009. – Т. 2, № 2. – С. 137–46.
2. Гершанович М.Л. Основные принципы лечения неходжкинских лимфом // Практическая онкология. – 2004. – Т. 5, № 3. – С. 185–93.
3. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. – Под ред. Давыдова М.И. – М: Практическая медицина, 2009. – 171 с.
4. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология неходжкинских лимфом // Практическая онкология. – 2004. – Т. 5, № 3. – С. 163–8.
5. Allen T.M., Brandeis E., Hansen C.B. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells // Biochim. Biophys. Acta. – 1995. – Vol. 1237. – P. 99–108.
6. Drummond D.C, Meyer O.M, Hong K. et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors // Pharmacol. Rev. – 1999. – Vol. 51. – P. 691–743.
7. Ferry J.A. Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis // The oncologist. – 2006. – Vol. 11. – P. 375–83.
8. Kelland L.R. «Of mice and men»: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development // Eur. J. Cancer. – 2004. – Vol. 40. – P. 827–36.
9. Li W.M., Mayer L.D., Bally M.B. Prevention of antibody mediated elimination of ligand -targeted liposomes by using poly (ethyleneglycol)- modified lipids // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics JPET. 2002. – Vol. 300. – P. 976–83.
10. Lopes de Menezes D.E., Pilarski L.M., Allen T.M. In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma // Cancer Research. – 1998. – Vol. 58. – P. 3320–30.
11. Noble C.O., Guo Z., Hayes M.E. et al. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2009. – Vol. 64. – P. 741–51.
12. 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.
13. Sausville E.A., Newell D.R. Preclinical models in cancer drug discovery and development // Eur. J. Cancer. – 2004. – Vol. 40. – P. 783–4.
14. Suggit M., Bibby M.C. Fifty years of preclinical anticancer drug screening empirical to target -driven approaches // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 971–81.
15. Troiani T., Schettino C., Martinelli E. The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2008. – Vol. 65. – P. 200–11.

УДК 616.006-441-08-059-092.9:611.13/16.018:577.21.088

Т.М. Соколова¹, З.А. Соколова², М.А. Рубцова², А.Ю. Барышников²**ЭКСПРЕССИЯ ИНТЕРФЕРОНЗАВИСИМЫХ И АПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ DU145: ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ИНТЕРФЕРОНОВ И ИХ ИНДУКТОРОВ – ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК**¹ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва²РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация***Соколова Татьяна Михайловна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории энзимологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН***адрес:** 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 16; **тел.:** +7(499)190-30-58**e-mail:** tmsokolovavir@mail.ru

Статья поступила: 26.02.2010, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

Цель исследования – характеристика клеток карциномы простаты DU145 в отношении экспрессии генов системы интерферона и апоптоза, имеющих важное значение для оценки прогрессии рака предстательной железы и лекарственной устойчивости. Показано положительное действие препаратов Альфарона, Ингарон и дсРНК-Ридостин и синтетического комплекса поли(И)-поли(Ц) на уровни транскрипции генов клеточной защиты и продукцию некоторых интерлейкинов. Сравнительный полуколичественный ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов позволил выявить стимуляцию синтеза мРНК ИФН- α , ИФН- β , олигоденилатсинтазы, РНК-азы L, дсРНК-протеинкиназы, Fas-антигена (CD95) и, вместе с тем – подавление мРНК протоонкогена *Bcl-2*. Обработка клеток DU145 препаратами ИФН и дсРНК приводила к синтезу ИЛ10 и ФНО- α и более высокой продукции ИЛ6. Полученные данные дают основание рекомендовать применение этих отечественных препаратов ИФН и дсРНК в качестве лекарственных средств у больных с РПЖ.

Ключевые слова: карцинома простаты – клеточная линия DU145, гены системы интерферона и апоптоза, препараты Альфарона, Ингарон и дсРНК-Ридостин.

Т.М. Sokolova¹, Z.A. Sokolova², M.A. Rubtsova², A.Yu. Baryshnikov²**EXPRESSION OF INTERFERON-DEPENDENT AND APOPTOSIS GENES IN CARCINOMA PROSTATE CELLS DU145: INFLUENCE PREPARATIONS OF INTERFERON AND ITS INDUCTOR – DOUBLE STRANDED RNAs**¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology, RAMS, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow**Abstract**

The aim of this study was to describe the expression of interferon system and apoptosis genes in prostate carcinoma cells DU145 which are known to of great importance in prostate cancer progression and therapeutic resistance. Here we show the positive effect of Alpharona, Ingaron, dsRNA-Ridostin and synthetic complex poly(I)-poly(C) in activation of cellular defense genes transcription and the protein levels of some interleukins. Comparative semiquantitative gene expression analysis by RT-PCR allowed to reveal the stimulation of IFN- α , IFN- β , oligoadenylate synthetase, RNase L, dsRNA-protein kinase, Fas-Ag(CD95) genes transcription, on the other hand, we observed the inhibition of protooncogene *Bcl-2* gene expression. Treatment of DU145 prostate carcinoma cells with IFN and dsRNA resulted in IL10 and TNF- α protein synthesis and increased IL6 production. Based on the data obtained, we could recommend IFNs and dsRNA for clinical treatment of patients with prostate cancer.

Key words: prostate carcinoma, DU145, interferons, apoptosis, expression, Alpharona, Ingaron, Ridostin.

Введение

Уровни экспрессии многочисленных онкогенов и их супрессоров в эпителиальных линиях клеток и тканях рака простаты активно изучаются [7]. Однако специальных исследований активности генов системы интерферона в раковых клетках простаты не проводилось. Недавние работы указывают на вероятную этиологическую роль нового ретровируса XMLV, родственного вирусу лейкоза мышей, в возникновении рака предстательной железы [8]. Поэтому важно исследовать эффекты препаратов ИФН и их индукторов, обладающих выраженной антивирусной и антипролиферативной активностью [2]. Кроме того, системы ИФН и апоптоза тесно взаимосвязаны между собой общими биохимическими механизмами регуляции [1; 2]. Так,

было показано, что РНКазы L и *Bcl-2* имеют важное значение в становление РПЖ [8; 10]. В данном исследовании использовали клетки рака РПЖ DU145. Эти клетки андрогеннезависимы, не продуцируют ПСА и имеют ряд генетических нарушений (делеции в хромосомах 1; 9; 11; хромосома 13 отсутствует).

Задачи исследования

1. Определить методом полуколичественного ОТ-ПЦР конститутивные уровни транскрипции ключевых мРНК систем интерферона (α -, β - и γ -ИФН, ферментов олигоденилатсинтазы (ОАС), РНК-азы L и дсРНК-зависимой протеинкиназы), мРНК факторов апоптоза Fas-Ag и *Bcl-2* и мРНК белка цитоскелета – гамма-актина;

2. Выявить влияние препаратов интерферонов, производимых в нашей стране (альфарона и ингарон), а также двуспиральных (дс) РНК (синтетический комплекс поли(И)-поли(Ц) и ридостин) на генную активность клеток DU145 и секрецию ими цитокинов. Эти данные важны не только для обнаружения изменений в уровнях экспрессии генов клеточного иммунитета в клетках рака простаты, но и для поиска новых дополнительных лекарственных средств коррекции систем клеточной защиты у больных РПЖ.

Материалы и методы

Клетки DU145

Опухолевая клеточная линия DU145 (рак предстательной железы) была получена из лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДитО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Клеточная линия имеет монослойный характер роста. Клетки линии DU145 культивировали в соответствующей полной среде RPMI-1640, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 10мМ NEPES (Sigma, США), 2мМ L-глутамин (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицина (ICN, США), аминокислоты, витамины (ICN, США). Клетки подерживали в логарифмической фазе роста и снимали с пластика раствором Версена.

Обработка клеток DU145 препаратами ИФН и дсРНК

Осуществляется внесением препаратов в свежую питательную среду RPMI-1640 с 10% ТЭС. Контрольные варианты клеток (без добавления препаратов ИФН и дсРНК) и опытные варианты клеток (с добавлением препаратов) дублированы в 2 флаконах. Дозы препаратов ИФН альфарона (рекомбинантный человеческий α 2-ИФН, «Фармаклон») 500 МЕ/мл, ингарон (рекомбинантный человеческий γ -ИФН, «Фармаклон») 1000 МЕ/мл, поли(И)-поли(Ц) 100 мкг/мл (Sigma, США) и ридостин (РНК киллерных штаммов дрожжей, содержащая 10% дсРНК, НПО «Вектор») 1000 мкг/мл. Инкубация клеток с препаратами ИФН проведена при 37 °С в течение 24 ч, с препаратами дсРНК – 2 ч при 37 °С. Затем клетки дважды промывали раствором фосфатного буфера с 0,1 М NaCl (рН 7,4) и выделяли РНК.

Транскрипцию мРНК определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР

Выделение РНК из клеток DU145 проводили с помощью набора для выделения суммарной клеточной РНК (RNAagents Total RNA isolation system «Promega»). К монослою клеток ($\sim 10^7$) добавляли буфер лизиса в объеме 600 мкл и экстрагировали в присутствии 0,2 М ацетата натрия (рН 5,5). РНК осаждали изопропанолом при -20 °С, осадок промывали 70 %-ным этанолом. Осадок РНК растворяли в воде с добавлением ингибитора нуклеаз (RNAsin 40 ед/мкл «Promega»). Половина тотальной РНК была очищена поли(А)РНК на магнитных частицах с пришитым олиго(дТ)30 («Силекс», Москва). Реакцию ОТ проводили на препарате суммарной РНК и поли(А) РНК с гексануклеотидными (random) и олиго(дТ)16 праймерами при 42 °С 1 ч. В инкубационной смеси концентрация фермента обратная транскриптаза MuLV составляла 200 ед/мкл. Аликвоты полученных кДНК разводили в 5–1000 раз и добавляли в ПЦР. Специфические пары праймеров для исследованных видов мРНК рассчитаны по известной первичной структуре с по-

мощью компьютерной программ Олиго3.4 [3; 4]. ПЦР проводили по следующей схеме: 50 циклов амплификации на матрицах кДНК в смеси с термостабильной Tag-полимеразой (5 ед/мкл) при Т отжига 50–52 °С, ДНК-инкубатор Bioexcellence.

ДНК-амплификаты анализировали электрофорезом в 1,5 %-ных агарозных гелях с бромистым этидием. Размер специфических продуктов устанавливали по положению ДНК-маркеров (DNA ladder 100–1000 bp).

Определение цитокинов методом ИФА

После инкубации клеток DU145 с препаратами ИФН и дсРНК (как описано выше) культуральную жидкость собирали для количественного определения интерлекинов ИЛ6, ИЛ10, фактора некроза опухолей ФНО- α и α 2-ИФН с помощью наборов реагентов ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург) согласно инструкции производителя. Результаты учитывали на приборе Titertek Multiskan при λ 450 нм.

Результаты и обсуждение

Транскрипционная активность ИФН-зависимых и апоптозных генов в клетках DU145

В табл. 1 суммированы результаты определения полуколичественным методом ОТ-ПЦР экспрессии группы генов системы ИФН и апоптоза в клетках DU145. Исследованы шесть генов кодирующих белки системы ИФН (α -; β - и γ -ИФН, ферменты олигоденилатсинтаза, РНК-азу L и дсРНК-зависимую протеинкиназу) и два гена-фактора регуляции апоптоза Fas-Ag и Bcl-2. Также проанализирована транскрипционная активность гена белка цитоскелета – гамма-актина.

Такой способ полуколичественного определения мРНК в клетках различного происхождения позволил ранее выявить изменения в экспрессии ИФН-зависимых и апоптозных генов при ряде вирусных инфекций и оценить эффективность действия антивирусных препаратов и индукторов ИФН [5; 6]. Представленные результаты получены на препаратах суммарной мРНК и поли(А)РНК из DU145 клеток (табл. 1; рис. А–Б). Установленные уровни транскрипции для очищенной поли(А)РНК были на 1–2 порядка ниже, чем для суммарной мРНК, по-видимому, вследствие потерь в процессе выделения фракции мРНК на олиго(дТ)-магнитных частицах, а также по причине отсутствия поли(А)-участков у части клеточных мРНК.

Поэтому применение метода выделения на олиго(дТ)-магнитных частицах, хотя и устраняет возможное загрязнение препарата другими видами нуклеиновых кислот, заметно занижает уровни определяемых мРНК. В то же время ОТ-ПЦР анализ на поли(А)РНК позволил увидеть эффективность действия препаратов ИФН и дсРНК на экспрессию клеточных генов.

Из представленных данных видно, что клетки DU145 характеризуются очень высокими конститутивными уровнями синтеза мРНК белка цитоскелета – γ -актина, процессинг которого однако нарушен: в составе ПЦР-продуктов (по данным электрофореза в агарозном геле, рис. Б) найдены более высокомолекулярные амплификаты.

В клетках DU145 достаточно высокие уровни экспрессии генов семейства α -ИФН, что согласуется с нашими данными о фибробластах и клетках крови человека [4; 5; 6].

Таблица 1

Влияние препаратов ИФН и дсРНК на транскрипционную активность ИФН-зависимых и апоптозных генов в клетках DU145

Виды мРНК	Конститутивный уровень (разведения кДНК)	Уровни после обработки препаратами ИФН и дсРНК (разведения кДНК)			
		Альфарона	Ингарон	Поли(И)-поли(Ц)	Ридостин
αИФН	100 1А	100 10А	10 <1А	100 10А	100 1А
βИФН	10 <1А	1 <1А	1 <1А	100 10А	10 <1А
γИФН	<1	<1	<1	<1	<1
ОАС	10 <1А	10 1А	50 5А	50 5А	50 5А
РНК-аза L	10 1А	10 10А	50 5А	10 5А	10 5А
ПК68	1	1	1	1	10
Fas-Ag (CD95)	10	10	100	100	100
Bcl-2	10	<1	<1	1	10
Г-актин	1000 1А Нарушен процессинг мРНК	1000 10А Индукция Восстановлен процессинг мРНК	1000 10А Индукция	1000 10А Индукция	1000 10А Индукция Восстановлен процессинг мРНК

А – результат получен с поли(А)РНК

Таблица 2

Продукция цитокинов клетками DU145 под действием ИФН и дсРНК

Виды цитокинов	Продукция цитокинов пг/мл (контроль без препаратов)	Продукция цитокинов в пг/мл (после воздействия препаратов ИФН и дсРНК)			
		Альфарона	Ингарон	Поли(И)-поли(Ц)	Ридостин
ИЛ6	250	250	670	860	680
ИЛ10	<30	250	500	600	500
ФНО-α	<10	550	810	700	410
α-2 ИФН	<50	<50	<50	<50	100

ИЛ – интерлейкины. Определение методом иммуноферментного анализа с наборами ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург)

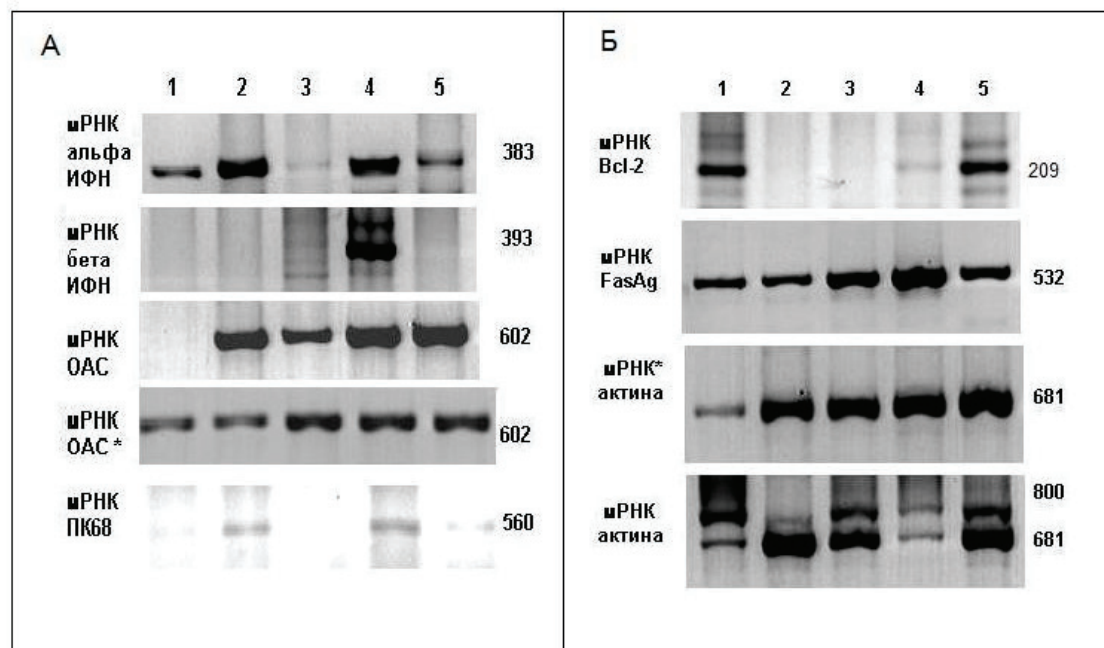


Рис. Уровни мРНК ИФН и ИФН-зависимых ферментов (А) и факторов апоптоза и γ-актина (Б) в клетках DU145: Электрофорез в 1,5%-ном агарозном геле с бромистым этидием. Дорожки: 1 – клетки без обработки препаратами; 2 – альфарона 500 МЕ/мл; 3 – ингарон 1000 МЕ/мл; 4 – поли(И)-поли(Ц) 100 мкг/мл; 5 – ридостин 1000 мкг/мл. Справа приведены размеры специфических ПЦР продуктов в нуклеотидных парах. А – ОТ-ПЦР-продукты полученные на поли(А)РНК. Б – ОТ-ПЦР-продукты получены на суммарной РНК, разведения кДНК 1/10. мРНК γ-актина* – ОТ-ПЦР на поли(А)РНК. ОАС* – ОТ-ПЦР на суммарной РНК, разведение кДНК 1/10.

Вместе с тем, в клетках DU145 повышенная активность генов бета-ИФН, ИФН-зависимых ферментов олигоденилатсинтетазы (ОАС1), рибонуклеазы (РНК-азы) L, дсРНК-зависимой протеинкиназы (ПК68) и протоонкогена *Bcl-2*. Перечисленные повышенные показатели системы ИФН объясняют присущую клеткам резистентность к воздействию внешних стрессовых факторов, характерную для трансформированных линий клеток. Показано, что все исследованные препараты повышают синтез мРНК гамма-актина и нормализует процессинг ее транскриптов с образованием зрелой формы, стимулируют транскрипцию мРНК ОАС1 и РНК-азы L. Воздействие на клетки DU145 препарата альфарона (рекомбинантного α -2 ИФН) вызывает стимуляцию транскрипцию поли(А)РНК α ИФН, ОАС, РНК-азы L, ПК68 и FasAg (CD95; см. табл. 1, рис. А–Б). Поли(И)-поли(Ц) заметно индуцирует синтез поли(А)РНК β -ИФН, повышает уровни мРНК α -ИФН и мРНК ПК68. Препараты ингарон (рекомбинантный γ -ИФН) и дсРНК оказывают определённый позитивный эффект на экспрессию апоптозного гена *Fas*. Все препараты, кроме ридостина, подавляет экспрессию протоонкогена *Bcl-2*, что является существенным для ограничения роста опухолевых клеток и активации в них процессов апоптоза [1; 11].

Индукция цитокинов

в клетках DU145 препаратами ИФН и дсРНК

Процесс воспаления – один из ключевых медиаторов развития РПЖ. ИЛ6 участвует в позитивной регуляции R13K/АКТ пути и андрогенрецепторной индукции [11]. Необходимо охарактеризовать способность раковых клеток секретировать в культуральную жидкость воспалительный цитокин ИЛ6, иммунорегуляторный ИЛ10 и апоптозный индуктор ФНО- α ;

а также – синтезировать α -2 ИФН и ответить на вопрос, будет ли увеличиваться в раковых клетках продукция этих факторов после воздействия препаратов ИФН и дсРНК, которые, как известно, участвуют в воспалительном ответе. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 2. По сравнению с контролем (культуральная жидкость клеток DU145 без добавления препаратов) использованные препараты (ингарон, поли(И)-поли(Ц) и ридостин) увеличивали в клетках DU145 синтез ИЛ6. В ответ на ИФН и дсРНК клетки DU145 синтезировали ИЛ10, который обладает противовоспалительной активностью и ФНО – активатор апоптоза. Поскольку повышенные уровни ИЛ6 являются плохим прогностическим признаком прогрессии рака простаты [9], а ИЛ10 может как усиливать, так и подавлять клеточные реакции иммунитета, эффект препаратов ИФН и дсРНК на клетки DU145 является благоприятным в основном в отношении индукции ФНО, вызывающем гибель раковых клеток. Такой препарат как дсРНК-ридостин индуцировал в клетках DU145 синтез определяемых количеств альфа2-ИФН. В целом клетки DU145 можно отнести к чувствительным к действию ИФН и дсРНК в отношении индукции антивирусного состояния и клеточного апоптоза. Однако надо учитывать, что ИФН относятся к воспалительным цитокинам и индуцируют синтез других факторов воспаления. Преимуществом препаратов ИФН является более низкая токсичность по сравнению с химиопрепаратами и цитостатиками. Полученные данные представляют особую важность не только для обнаружения изменений в уровнях экспрессии генов клеточного иммунитета в клетках рака простаты, но и для поиска новых дополнительных лекарственных средств коррекции систем клеточной защиты у больных РПЖ.

Выводы

1. Получены количественные конститутивные характеристики транскрипции конститутивных генов ИФН (α -, β - и γ -) и ИФН-зависимых ферментов (ОАС, РНК-азы L, дсПК), регуляторов апоптоза – Fas-гена и протоонкогена *Bcl-2* и белка цитоскелета – γ -актина на клетках DU145, выведенных в клеточную линию из метастазов мозга мужчины с РПЖ [12].
2. При воздействии на клетки DU145 отечественных препаратов α 2-ИФН (альфарона), γ -ИФН (ингарон) и препаратов дсРНК (ридостин и синтетического комплекса поли(И)-поли(Ц)) происходит активация транскрипции генов системы ИФН и апоптозного Fas-гена в сочетании с подавлением транскрипции гена *Bcl-2*. Обнаружена также индукция процессинга транскриптов мРНК γ -актина.
3. Препараты ИФН и дсРНК вызывают в клетках DU145 РПЖ повышенную продукцию цитокинов: возрастает секреция воспалительного ИЛ-6, ФНО- α иммунорегуляторного ИЛ-10, а также синтезируется α 2-ИФН при воздействии дсРНК –ридостин.

Литература

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 320 с.
2. Ершов Ф.И., Киселёв О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) – М.: Гэотар Медицина, 2005. – 368 с.
3. Соколова Т.М., Урываев Л.В. Способ определения цитокинового статуса человека на генетическом уровне. Патент на изобретение №2181773, 27 апреля 2002 г.
4. Соколова Т.М., Бибикова О.В., Быстров Н.С., Урываев Л.В. Экспрессия генов системы интерферона и клеточного апоптоза в пробах крови человека // Вопросы вирусологии. – 2005. – № 1. – С. 19–23.
5. Соколова Т.М., Урываев Л.В., Тазулахова Э.Б. и др. Индивидуальные изменения экспрессии генов системы интерферона в клетках крови человека под влиянием амиксина и циклоферона // Вопросы вирусологии. – 2005. – № 2. – С. 32–6.
6. Соколова Т.М., Федорова Н.Е., Меджидова М.Г. и др. Механизмы клеточной резистентности к цитомегаловирусу связаны с транскрипционной активностью генов лейкоцитарного и иммунного интерферонов // Медицинская иммунология. – 2007. – № 4–5. – С. 457–66.
7. Creighton C.J. A gene transcription signature associated with hormone independence in a subset of both breast and prostate cancers // BMC Genomics. – 2007. – Vol. 8. – P. 199–210.
8. Dong B., Kim S., Hong S. et al. An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors // PNAS. – 2007. – Vol. 105(5). – P. 1655–60.
9. George D.J., Halabi S., Shepard T.F. et al. The prognostic significance of plasma interleukin-6 levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: Results from cancer and leukemia group B 9480 // Clin Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 1815–20.
10. McCarty M.F. Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: Multifocal signal 1 modulation therapy // Integr. Cancer Ther. – 2004. – Vol. 3(4). – P. 349–80.
11. McKenzie S., Kyprianou N. Apoptosis evasion: the role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance // J Cell Biochem. – 2006. – Vol. 97(1). – P. 18–32.
12. Stone K.R., Mickey D.D., Wunderli H. et al. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145) // Int. J. Cancer. – 1978. – Vol. 21(3). – P. 274–81.

УДК 616-006-085.371.009.036

Н.П. Ермакова, И.Н. Михайлова, И.Б. Меркулова, О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Т.В. Абрамова,
К.А. Барышников, Л.М. Михайлова

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ «МЕЛАВАК»

РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва

Контактная информация

Ермакова Надежда Павловна, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии и токсикологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел.: +7(499)612-78-83

e-mail: ne518@yandex.ru

Статья поступила: 22.07.2010, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

Проведено доклиническое токсикологическое изучение противоопухолевой вакцины «Мелавак» с целью оценки ее безопасности и прогноза побочных и токсических эффектов при клиническом изучении у больных меланомой. Изучены локальная и системная токсичность, аллергенные свойства и туморогенность вакцины. Противоопухолевая вакцина «Мелавак» нетоксична и рекомендована для клинической апробации.

Ключевые слова: вакцина, ген ГМ-КСФ, безопасность, аллергенность, туморогенность.

*N.P. Ermakova, I.N. Mikhaylova, I.B. Merkulova, O.I. Konyaeva, N.Yu. Kulbachevskaya, T.V. Abramova,
K.A. Baryshnikov, L.M. Mikhaylova*

PRE-CLINICAL STUDY OF ANTICANCER VACCINE «MELOVAC» TOXICITY

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

Abstract

The aim of this study was to examine the safety and prognosis of side and toxic effects of anticancer vaccine «Melovac». We have studied the local and systemic toxicity, its ability to be allergic and tumorigenic. Based on our pre-clinical study which reveal that «Melovac» vaccine is not toxic, we recommend it for clinical trials.

Key words: vaccine, GM-CSF gene, safety, allergenicity, tumorigenicity.

Введение

В последние годы широко изучается активная специфическая иммунотерапия злокачественных новообразований цельноклеточными вакцинами, которые представляют собой живые аллогенные или аутологичные опухолевые клетки. В 1997 г. M. Drew Pardoll с соавт. запатентовали метод лечения и профилактики рецидивов меланомы, основанный на вакцинации аллогенными клетками, несущими общие меланомные антигены трансфицированные геном человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). В последующем были созданы аналогичные вакцины на основе аллогенных и аутологичных ГМ-КСФ-трансфицированных клеточных линий меланомы, а также немелкоклеточного рака легкого [5–7] и рака простаты [9]. Эти вакцины под общим названием GVAX проходят клинические испытания по I–II фазе. На I фазе клинических испытаний R. Soiffer и соавт. было показано, что вакцинация облученными аутологичными клетками меланомы, секретирующими человеческий ГМ-КСФ, вызывает мощный противоопухолевый иммунитет у пациентов с диссеминирующей меланомой. Вакцину вводили внутривенно и подкожно, начальная «стартовая» доза составляла 10 млн. клеток на человека [10].

В Институте биологии гена РАН совместно с РОНЦ была создана аналогичная GVAX цельноклеточная вакцина под названием «Мелавак», которая явилась объектом данного исследования.

Целью нашей работы явилось доклиническое изучение токсичности противоопухолевой вакцины «Мелавак» для оценки ее безвредности, прогноза побочных эффектов и потенциальных «рисков» при применении человеку.

Материалы и методы

Вакцина «Мелавак» представляет собой клеточную линию меланомы человека Mel Kor [2] стабильно трансфицированную человеческим геном ГМ-КСФ, имеет генетическую конструкцию: вектор *pBK – CMV (Clon Tech, США)* со встроенной к ДНК ГМ-КСФ человека. Вид трансфекции – липофекция, интегрированная. Метод трансфекции – липофекция, при помощи набора Unifectin 56. Уровень трансфекции – 100 %. Количество секретируемого ГМ-КСФ клетками – 78,1–84,0 нг/1 млн клеток /24 ч. Перед введением животным инактивирована на установке АГАТ-Р γ -облучением в дозе 100 Гр.

Исследование безвредности вакцины «Мелавак» проводили на стандартных сертифицированных животных в соответствии с российскими и международными требованиями по использованию животных моделей в доклинических исследованиях для клеточной и генной терапии [3; 4]. Животные: 80 мышей-самцов (СВА×С57В1/6j)F₁, массой 20–22 г; 60 неинбредных крыс-самцов массой 170–250 г; 40 морских свинок-самок альбиносов массой 230–250 г и 42 кролика породы «Шиншилла» массой 1,7–2,2 кг.

Мыши были получены из питомника лабораторных животных «Столбовая» РАМН; крысы – из разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; кролики – из ФГУП «Опытно-производственное хозяйство «Манихино»; морские свинки – из питомника ГУНЦ Биомедицинских технологий РАМН, Филиал «Андреевка». 22 гибридных иммунодефицитных мышей-самок линии *Balb/c nude* массой 18–20 г получены и содержались в специализированном кондиционированном отсеке РОНЦ при дозированном световом режиме, на стерильных бумажной подстилке, корме «МЭСТ» (Москва) и воде.

Вакцину «Мелавак» применяли при в/к и п/к путях введения. В качестве контроля во всех исследованиях использовали в/к и п/к введение изотонического раствора хлористого натрия в адекватном объеме. Дозы вакцины «Мелавак», изученные в экспериментах по локальной и системной токсичности, лимитировались максимальным общим объемом вводимой в/к вакцины (не более 0,5 мл на мышшь или крысу) и ее концентрацией (1×10^8 кл/мл). По окончании исследования мышшь, крысы и кролики были умерщвлены методом усыпления эфиром с последующим проведением аутопсии и патоморфологического исследования.

Изучение локальной токсичности проводили на кроликах и крысах. Вакцину вводили однократно в/к или п/к в области спины в дозе 5×10^5 кл/кг кролика в концентрациях 1×10^7 или 1×10^8 кл/мл. На 3; 5; 14 и 30 сутки опытных и контрольных кроликов умерщвляли. Крысам вакцину вводили в/к ежедневно на протяжении 7 дней в СД $1,03 \times 10^7$ или $10,3 \times 10^7$ кл/мл. В качестве контролей использовали животных интактных и животных, которым аналогично вводили физиологический раствор. Для патоморфологического исследования крыс из опытных и контрольных групп умерщвляли на 1-е и 75-е сутки.

Исследование «острой» токсичности проводили на мышшах и крысах при однократном в/к введении. Критериями оценки «острой» токсичности были: изменение массы и температуры тела, количество лейкоцитов, клиническая картина интоксикации, поведенческие реакции, аутопсия умерщвленных в конце опыта животных. Мышам «Мелавак» вводили в/к в подушечки стоп в дозах, превышающих предполагаемую дозу для человека в 1000 раз – $206,0 \times 10^7$ кл/кг; в 100 раз – $20,6 \times 10^7$ кл/кг; в 10 раз – $2,06 \times 10^7$ кл/кг и адекватную предполагаемой дозе для человека – $0,203 \times 10^7$ кл/кг. Концентрация вводимой животным клеточной суспензии была от 1×10^7 до 5×10^7 кл/мл; объем от 0,05 до 0,5 мл (на 1–10 инъекций). Длительность наблюдения за животными составляла 30 дней. Тест «выздоровление» или тест развития «токсических эффектов» проводили в отдельных исследованиях на мышшах со сроком наблюдения 140 дней. Крысам вакцину вводили в/к в область спины около хвоста в дозах, превышающих предполагаемую дозу для человека в 100 раз – $10,3 \times 10^7$ кл/кг; в 10 раз – $1,03 \times 10^7$ кл/кг и адекватную предполагаемой дозе для человека – $0,103 \times 10^7$ кл/кг.

Исследование «хронической» токсичности были проведены на неинбредных крысах. Вакцину «Мелавак» вводили в/к ежедневно в течение 7 дней. Крысы получали вакцину в суммарных дозах, превышающих предполагаемую дозу для человека в 100 раз – $10,3 \times 10^7$ кл/кг и в 10 раз – $1,03 \times 10^7$ кл/кг и дозу адекватную предполагаемой дозе для человека – $0,103 \times 10^7$ кл/кг. Критериями оценки «хронической» токсичности на крысах были: клиническая картина интоксикации животных, изменения поведенческих реакций, массы тела, клини-

ко-лабораторные и функциональные показатели здоровья (клинический и биохимический анализ крови, анализ мочи, ЭКГ), данные аутопсии с макроскопической и гистологической оценкой. Продолжительность наблюдения составляла 120 суток.

Для исследования туморогенности вакцины «Мелавак» использовано 22 гибридные иммунодефицитные мышши-самки линии *Balb/c nude*. Мышсам, служившим позитивным контролем, вводили неинaktivированные опухолевые клетки линии Mel Kog в дозе 1×10^7 клеток п/к в область боковой поверхности тела в объеме 0,2 мл. Мышсам второй группы вводили вакцину «Мелавак» аналогичным способом в том же объеме и том же количестве клеток, что и контрольным мышсам. Места инокуляции клеток осматривали и при наличии опухолевидных образований измеряли их и вычисляли объем последних. Мыши контрольной группы с развившимися опухолями были умерщвлены на 14-е сутки опыта, мышши, получившие вакцину «Мелавак» – на 21–63 сутки по мере ухудшения состояния здоровья. На аутопсии проводили осмотр мест инокуляции и внутренних органов, делая бритвой послонные разрезы для визуального контроля мета-статических поражений. Для гистологического исследования брали участки головного мозга, сердца, легких, печени, почек, лимфатических узлов, селезенки, костного мозга, а также участки кожи и опухолевидные образования с места введения вакцины или клеток линии Mel Kog.

Аллергизирующее действие вакцины «Мелавак» оценивали по способности вызывать анафилактический шок у предварительно сенсибилизированных животных [3]. Для сенсибилизации морским свинкам вакцину применяли через день в/м однократно и п/к двукратно в суммарных дозах, равных терапевтической для морской свинки или в 10 раз ее превышающей. Аналогично вводили изотонический раствор хлористого натрия и сыворотку крупнорогатого скота (СКРС). Вакцину «Мелавак» применяли в концентрациях 1×10^6 или 1×10^7 клеток в 1 мл физиологического раствора. Для сенсибилизации препарат вводили двум группам животных в разовых дозах $0,3 \times 10^6$ или $3,0 \times 10^6$ кл/кг через день (первое введение – п/к, два других – в/м), для разрешения – в суммарных дозах $0,91 \times 10^6$ и $9,1 \times 10^6$ кл/кг соответственно. Разрешение проводили внутрисердечно на 15-й день после окончания сенсибилизации. После введения разрешающей дозы вакцины и контрольных препаратов за животными наблюдали в течение 48 ч. Оценку интенсивности реакции осуществляли по Weigle [11]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы «Статграф». Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Изучение локальной токсичности

При введении вакцины «Мелавак» в концентрации 1×10^7 кл/мл кроликам местно-раздражающего действия не выявлено. Однако при введении вакцины в концентрации 1×10^8 кл/мл у кроликов отмечена местно воспалительная реакция, проявляющаяся в отеке и гиперемии и обратимая на 7-й день. При в/к многократном введении вакцины «Мелавак» крысам наблюдали умеренную местную воспалительную реакцию на 1-е сутки. На 75-е сутки макроскопических и микроскопических изменений в коже и в подкожной клетчатке отмечено не было.

Исследование «острой» токсичности

Выявлено кратковременное достоверное снижение температуры тела на 2,3 и 2,1 °С через 3 ч после введения вакцины только у мышей при применении «Мелавака» в дозах, превышающих предполагаемую дозу для человека соответственно в 1000 и 100 раз.

Выявлено дозозависимое обратимое увеличение количества лейкоцитов в периферической крови мышей и крыс.

У мышей увеличение количества лейкоцитов в 2,5 раза наблюдалось на 1-й и 3-й часы после введения в дозах, превышающих предполагаемую дозу для человека в 1000 раз.

При введении вакцины в дозах, превышающих предполагаемую дозу для человека в 100 и 10 раз, наблюдалось увеличение количества лейкоцитов в 2 раза только через 3 ч с восстановлением во всех группах к 7-м суткам наблюдения (табл. 1).

У крыс увеличение количества лейкоцитов в 1,3 раза наблюдалось через 3 ч только в дозе, превышающей предполагаемую дозу для человека в 100 раз, с восстановлением до исходного уровня через 24 ч (табл. 2).

При проведении аутопсии крыс на 30 сутки наблюдения зафиксирована очаговая гиперпигментация (меланоз) в подкожной клетчатке в местах внутрикожного введения вакцины (рис. 1).

Других изменений со стороны органов и тканей не отмечено.

При гистологическом исследовании кожи из участков меланоза в подкожной клетчатке обнаружены скопления тучных клеток и концевые отделы потовых желез.

Наблюдавшаяся очаговая гиперпигментация в местах в/к введения вакцины «Мелавак» могла быть обусловлена несколькими причинами:

1. Возможностью влияния облучения на меланомные клетки, используемые для вакцинации, в результате чего при разрушении *in vivo* меланин выходит в ткани, окрашивая их.
2. Активацией синтеза меланина факторами микроокружения.
3. Миграцией пигмента в составе макрофагов в ходе воспалительной реакции.

Исследование «хронической» токсичности

Установлено, что вакцина «Мелавак» при ежедневном в/к введении крысам в течение 7 дней во всех исследованных дозах не влияет на общее состояние и поведенческие реакции животных, не изменяет функционального состояния почек, сердца, не оказывает влияния на гематологические показатели периферической крови и не изменяет функции желудочно-кишечного тракта.

Выявлено, что вакцина «Мелавак» при ежедневном многократном введении крысам оказывает дозозависимое влияние на функции печени, увеличивая активность ЛДГ, АЛТ и АСТ в 2 раза, и действует на углеводный обмен, повышая содержание глюкозы в сыворотке крови животных в 2,5 раза (табл. 3).

Наблюдаемые изменения со стороны печени животных могут быть связаны с известным токсическим действием секреторируемого ГМ-КСФ, а также с действием других цитокинов, поступающих с опухолевой клеточной массой [1].

На аутопсии у крыс обнаружено дозозависимое увеличение регионарных паховых лимфатиче-

ских узлов примерно в 1,5 раза и уменьшение массы печени в 1,5–2 раза. В остальных органах и тканях животных визуальных патологических изменений не отмечено.

При исследовании туморогенности вакцины «Мелавак» на 4-й день после введения у 4 из 11 иммунодефицитных мышей под кожей на месте инокуляции клеточной суспензии визуализировались светлые плоские пятна площадью 9–16 мм², которые в последующие дни уменьшались и полностью исчезали к 14-м суткам.

На аутопсии у 6 мышей со стороны подкожной клетчатки в месте инокуляции обнаруживали лишь следы подкожного введения вакцины в виде незначительных плоских рубчиков или участка васкуляризации.

У остальных 5 мышей, умерщвленных позднее, в том числе в конце опыта (63-и сутки) на месте инокуляции изменений кожи и подкожной ткани не было, опухоли не обнаружены.

Вакцина «Мелавак» не вызвала развития меланом у всех 11 животных до 63 суток наблюдения (рис. 2).

При макроскопическом и гистологическом исследовании внутренних органов и головного мозга мышей метастазы или другие опухолевые поражения не обнаружены.

При подкожном введении мышам жизнеспособных опухолевых клеток линии Mel Kog на 4 день наблюдения под кожей в месте инокуляции клеточной суспензии у 7 из 11 мышей визуализировались светлые плоские пятна, которые со временем увеличивались в объеме и к 14 дню наблюдения у всех 11 мышей этой группы появились опухолевые узелки объемом от 144 мм³ до 266 мм³ (рис. 3).

При гистологическом исследовании все опухоли представляли собой образования солидного строения и по морфологическим признакам соответствовали меланоме.

При макроскопическом и гистологическом исследовании внутренних органов и головного мозга метастазы не обнаружены.

При изучении аллергизирующего действия вакцины выявлено, что у всех групп животных после введения разрешающей дозы вакцины в отличие от животных, получивших СКРС, внешних проявлений аллергизирующего действия не наблюдали. Выявлена только слабая аллергическая реакция, которая выражалась в кратковременном понижении температуры тела на 1,2 °С у морских свинок, получивших 10-кратную терапевтическую дозу вакцины «Мелавак».

Таким образом, на основании полученных данных установлено, что вакцина «Мелавак» обладает слабыми аллергенными свойствами (табл. 4).

Заключение

В результате изучения локальной токсичности вакцины «Мелавак» при однократном и многократном в/к введении животным выявлена обратимая местная воспалительная реакция, интенсивность которой зависит от концентрации. При изучении «острой» токсичности установлено, что при однократном п/к и в/к введении вакцина «Мелавак» в диапазоне доз, превышающих предполагаемую дозу для человека в 1000–10 раз (мышь) и в 100–10 раз (крысы), хорошо переносится животными.

Иллюстрации 1–3 см. на стр. V

Таблица 1
Изменение общего числа лейкоцитов (тыс/мм³) в периферической крови мышей (CBA×C₅₇Bl/6j)F₁ после однократного внутривенного введения вакцины «Мелавак»

Доза (кл/кг)	Сроки наблюдения						
	0	1 час	3 часа	1 сутки	2 сутки	7 сутки	
206,0×10 ⁷	10,7±2,0	35,6±7,7**	32,5±6,8**	17,0±4,8	20,9±3,1	15,7±3,3	
20,6×10 ⁷	10,7±2,0	16,1±3,7	29,6±6,5*	20,5±3,8	24,9±3,1	10,7±3,3	
2,06×10 ⁷	11,7±0,8	15,0±1,8	25,7±2,7*	17,2±5,7	25,5±3,0	10,4±3,7	
0,206×10 ⁷	10,8±2,3	21,3±2,6*	23,3±4,5	24,4±2,6	23,4±3,3	9,7±2,9	
Контроль	10,6±1,5	13,7±1,6	15,7±4,0	16,5±3,8	15,9±3,1	10,1±3,3	
Различия с контрольной группой достоверны: *p < 0,05; **p < 0,01.							

Таблица 2
Изменение общего числа лейкоцитов (тыс/мм³) в периферической крови неинбредных крыс после однократного внутривенного введения вакцины «Мелавак»

Доза (кл/мл)	Сроки наблюдения						
	0	1 час	3 часа	1 сутки	2 сутки	5 сутки	7 сутки
10,3×10 ⁷	14,7±2,0	12,5±1,6	21,0±2,0*	12,1±1,4	17,9±2,9	14,5±1,9	14,1±1,1
1,03×10 ⁷	14,7±1,7	14,9±3,1	15,4±1,5	15,7±3,1	18,5±3,9	10,6±2,3	10,9±1,9
0,103×10 ⁷	13,8±2,1	10,1±1,4	12,6±1,4	12,7±2,3	13,4±1,3	11,6±2,4	11,7±2,1
Контроль	13,0±1,0	14,0±2,1	15,7±1,8	14,9±1,8	14,3±2,7	11,3±1,8	10,8±1,2
Различия с контрольной группой достоверны: *p < 0,05.							

Таблица 3

Биохимические показатели активности ферментов и уровня общего билирубина в сыворотке крови неинбредных крыс после ежедневного в/к введения вакцины «Мелавак» в течение 7 дней

Доза, кл./кг	Показатели	Сроки наблюдения (сутки опыта)			
		1	21	75	120
$10,3 \times 10^7$	Билирубин О., мкмоль/л	1,0±0,2	1,2±0,2	3±0	1,7±0,1
$1,03 \times 10^7$		0,5±0,4	1,9±0,4	3±0	1,3±0,3
Контроль		0,9±0,2	1,3±0,5	2,5±0,9	1,5±0,5
$10,3 \times 10^7$	АЛТ, ед/л	37,2±1,2	47,2±5,2	48,4±5,5	80,5±25,4*
$1,03 \times 10^7$		40,1±4,4	40,8±4,4	71,7±9,4	88,5±66,9
Контроль		41,1±3,1	41,1±3,1	42,8±5,0	30,6±3,9
$10,3 \times 10^7$	АСТ, ед/л	146±16	139±18	89±6	243±92**
$1,03 \times 10^7$		128±13	127±11	99±16	153±62
Контроль		120±10	120±10	106±2	76±3
$10,3 \times 10^7$	ЛДГ, ед/л	1848±421**	1570±421*	441±50	1461±798
$1,03 \times 10^7$		797±78	768±78	466±189	1596±625
Контроль		707±106	681±106	690±15	666±147
$10,3 \times 10^7$	ЩФ, ед/л	316±43	216±43	137±11	117±30
$1,03 \times 10^7$		389±57	289±57	187±32	107±10
Контроль		385±131	285±131	162±6	118±29
$10,3 \times 10^7$	Глюкоза, ммоль/л	6,5±0,4	9,2±3,5	12,7±3,8	7,5±1,1
$1,03 \times 10^7$		4,7±0,9	10,1±3,2	14,1±3,2*	6,8±2,3
Контроль		5,1±0,4	6,2±4,0	5,6±4,3	6,8±1,8

Различия с контрольной группой достоверны * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Таблица 4

Реакция активной анафилактики после применения вакцины «Мелавак» морским свинкам

№	Сенсибилизация	Разрешение	Оценка реакции	
			Реакция/всего животных	Интенсивность по <i>Weigle</i>
1	вакцина «Мелавак» $3,0 \times 10^6$ кл./кг/48ч×3раза	вакцина «Мелавак» $9,0 \times 10^6$ кл./кг	7/10	слабая
2	вакцина «Мелавак» $0,30 \times 10^6$ кл./кг/48ч×3раза	вакцина «Мелавак» $0,9 \times 10^6$ кл./кг	0/10	нет
3	0,9 %-ный раствор NaCl	вакцина «Мелавак» $9,0 \times 10^6$ кл./кг	0/5	нет
4	0,9 %-ный раствор NaCl	0,9 %-ный раствор NaCl	0/5	нет
5	СКРС	СКРС	9/10	сильная

Проведенные исследования по «хронической» токсичности в дозах, превышающих предполагаемую дозу для человека в 100–10 раз, выявили, что вакцина «Мелавак» дозозависимо влияет на функции печени, увеличивает активность ЛДГ, АЛТ и АСТ, а также повышает содержание глюкозы в сыворотке крови животных. Вакцина «Мелавак» не влияет на общее состояние и поведение животных, не изменяет морфофункционального состояния почек, сердца, желудочно-кишечного канала и не оказывает влияния на показатели периферической крови.

Вакцина «Мелавак» в отличие от опухолевой клеточной линии Mel Kor не обладает туморогенным действием. Вакцина «Мелавак» обладает слабыми аллергенными свойствами.

Таким образом, проведенные токсикологические исследования показали, что вакцина «Мелавак» безопасна при однократном и многократном внутривенном применении лабораторным животным разных видов и может быть рекомендована в качестве терапевтической противоопухолевой вакцины для клинической апробации.

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. Граноцит. – Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. – М.: АстраФармСервис, 2009. – С. Б-506–Б-507.
2. Михайлова И. Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под ред. Р.У. Хабриева. 2 изд. перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – С.13–23; 41–69; 170–204.
4. FDA Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy. – 1998.– (FDA [21CFR ch (4 – 1 – 02 Edition) Part 58]).
5. Greten T.F., Jaffee E.M. Cancer vaccines // J. Clin. Oncol. –1999. – Vol.17(3). – P. 1047–60.
6. Nemunaitis J., Nemunaitis J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transfected autologous tumor cell vaccine: focus[correction to focus] on non-small-cell lung cancer // Clin Lung Cancer. – 2003. – Vol. 5(3). – P. 148–57.
7. Nemunaitis J. GVAX (GMCSF gene modified tumor vaccine) in advanced stage non small cell lung cancer // J. Control Release. – 2003. – Vol. 91(1–2). – P. 225–31.
8. Parmiani G., Rodolfo M., Melani C. Immunological gene therapy with ex vivo gene-modified tumor cells: a critique and a reappraisal // Human Gene Therapy. – 2000. – Vol. 11. – P. 1269–75.
9. Simons J.W., Sacks N. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic cancer cellular immunotherapy: the GVAX vaccine for prostate cancer // Urol. Oncol. – 2006. – Vol. 24(5). – P. 419–24.
10. Soiffer R., Lynch T., Mihm M. et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – Immunology. – 1998. – Vol. 95. – P. 13141–6.
11. Weigle W.O., Cochrane G., Dixon F.L. Anaphylactogenic Properties of Soluble Antigen-Antibody Complexes in the Guinea Pig and Rabbit // J. Immunol. – 1960. – Vol. 95. – P. 5.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

УДК 616.5-006.81:615.371.015.44

И.Н. Михайлова¹, П.В. Иванов², Н.Н. Петенко¹, К.А. Барышников¹, Л.Ф. Морозова¹, О.С. Бурова¹,
Е.А. Черемушкин¹, С. Субраманиан¹, Г.З. Чкадуа¹, А.Ю. Барышников¹, Л.В. Демидов¹

ВНУТРИКОЖНАЯ КЛЕТОЧНАЯ РЕАКЦИЯ НА ФОНЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Контактная информация

Михайлова Ирина Николаевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела биотерапии опухолей НИИ клинической онкологии РОНЦ, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН
адрес: 115478 Москва, Каширское ш., 24; тел.: +7(495)324-90-34
e-mail: inmih@nm.ru

Статья поступила: 18.11.2009, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

Изучены лимфоидные структуры биоптатов кожи пациентов с меланомой при проведении им вакцинотерапии модифицированными аллогенными опухолевыми или аутологичными дендритными клетками. Наибольшая выраженность изменений клеточного состава кожи отмечена после вакцинации аллогенной вакциной по сравнению с вакцинацией аутологичными дендритными клетками.

Ключевые слова: меланома, иммунокомпетентные клетки, противоопухолевая вакцинотерапия.

I.N. Mikhaylova, P.V. Ivanov, N.N. Petenko, K.A. Baryshnikov, L.F. Morosova, O.S. Burova, E.A. Cheremushkin, S. Subramanian, G.Z. Chkadua, A.Yu. Baryshnikov, L.V. Demidov

**IMMUNE REACTION OF THE SKIN
IN MELANOMA PATIENTS AFTER VACCINE THERAPY**
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow
I.M. Sechenov Moscow Medical Academy

Abstract

Lymphoid structures of the skin were studied in melanoma patients after antitumor vaccination. We have studied biopsy material of the skin using standard and immunohistochemical methods of staining. Patients with allogenic gene-modified tumor cell based vaccine showed well-defined morphological changes of the skin in comparison with patients who received autologous dendritic cell vaccine primed with oncolysate *in vitro*.

Key words: melanoma, immunocompetent cells, antitumor vaccinotherapy.

Введение

Механизмы иммунного ответа в настоящее время представляются достаточно изученными. Значительно в меньшей степени известны принципы реализации иммунных реакций в коже. Впервые предположение о том, что кожные покровы являются генератором и местом развития иммунной гиперчувствительности высказал в 1930 г. М.В. Sulzberger. С 1970 г. К. Fichtelius и соавт. изучали вопрос об участии кожи в иммунных реакциях организма как лимфоидного органа первичного уровня. В 1980-х гг. сформировалась теория о коже как органе центрального и периферического иммуногенеза [2; 5; 13]. За последние годы накоплены новые данные об иммунных функциях [4; 7; 8; 9; 11]. Установлена корреляция между выраженностью показателей иммунных реакций в периферической крови и изменениями клеточного состава кожи [6]. Описаны реакции иммунных структур кожных покровов при ВИЧ-инфекции [1; 12], а также их участие в развитии опухолевых процессов [3].

Имеются данные, позволяющие рассматривать кожу как орган, аналогичный тимусу [2; 10]. Поскольку введенные противоопухолевые вакцины в виде дендритных и аллогенных клеток оказывают системное иммуномодулирующее воздействие, представляет интерес изучение клеточного состава кожи в процессе противоопухолевой вакцинации.

Цель исследования – изучение клеточного состава кожи пациентов с диссеминированной меланомой в процессе терапии аллогенной или дендритной вакциной.

Материалы и методы

Пациентам с диссеминированной меланомой кожи проводилась иммунотерапия противоопухолевыми вакцинами на основе аутологичных дендритных или модифицированных опухолевых аллогенных клеток. Вакцина вводилась пациентам внутрикочно в несколько точек (от 2 до 10) в непосредственной близости от регионарных лимфатических коллекторов. Однократная доза введения клеток составляла от $1,0$ до $3,0 \times 10^6$ клеток для дендритной вакцины и до $30,0 \times 10^6$ для аллогенной, интервалы между вакцинациями составляли 1–2 нед. Биопсия кожи производилась перед первой и третьей вакцинациями в отдалении от места вакцинации, в подлопаточной области на 1–2 см ниже угла лопатки по лопаточной линии. Повторная биопсия проводилась перед третьим введением вакцины в подлопаточной области противоположной стороны. Толщина биоптата составляла около 1,5–2 мм, включая фрагмент слоя гиподермы. Исследовались образцы тканей $10 \times 10 \times 3$ мм. Подготовка материала проводилась согласно стандартному протоколу с помощью окраски гематоксилином-эозином.

Таблица 1

Иммуногистохимическая характеристика клеток до терапии дендритными клетками

Слой кожи Клетки	Сосочковый слой		Сетчатый слой		Потовые железы		Сальные железы	
	Внесосудистая зона Периваскулярные пространства		Внесосудистая зона Периваскулярные пространства		М±м	%	М±м	%
	М±м	%	М±м	%				
CD3	0,73±0,69	0,2±0,2	6,6±1,6	4,96±1,55	0	0	0	0
CD8	0,73±0,52	0,82±0,65	5,85±0,81	6,2±1,36	0	0	0,3±0,2	0,3±0,2
CD14	0	0	10±1,88	0,83±0,5	0	0	0	0
CD20	0	0	5,95±1,58	5,84±2,04	0	0	0	0
CD56	2,3±0,26	18,03±2,44	2,92±0,32	25,22±3,66	1,9±0,35	6,64±1,9	1,6±0,3	9,65±2,3
CD83	1,57±0,4	12,9±3,65	2,37±0,5	7,74±1,66	0	0	0,6±0,24	0,65±0,29

Таблица 2

Иммуногистохимическая характеристика клеток после терапии дендритными клетками

Слой кожи Клетки	Сосочковый слой		Сетчатый слой		Потовые железы		Сальные железы	
	Внесосудистая зона Периваскулярные пространства		Внесосудистая зона Периваскулярные пространства		М±м	%	М±м	%
	М±м	%	М±м	%				
CD3	2,38±1,18	2,53±1,25	1,47±0,48	2,17±0,86	0	0	0	0
CD8	6±0,7	2,1±1,06	0	0	0	0	0	0
CD14	2±1,7	0,397±0,394	0	0	0	0	0	0
CD20	0,2±0,19	1,58±1,57	0,5±0,38	1,8±1,36	0	0	0	0
CD56	4,18±0,93	40,24±3,37	4,02±0,5	32,6±3,66	1,8±0,67	2,7±1,0	0,9±0,33	3,7±1,88
CD83	0,85±0,2	2,05±0,8	1,66±0,3	7,59±1,97	1,33±0,56	0,48±0,27	0	0

Таблица 3

Иммуногистохимическая характеристика клеток до терапии вакциной Аллоген

Слои кожи Клетки	Сосочковый слой		Сетчатый слой		Потовые железы		Сальные железы	
	Внесосудистая зона Периваскулярные пространства		Внесосудистая зона Периваскулярные пространства		M±m	%	M±m	%
	M±m	%	M±m	%				
CD3	1,95±0,37	18,73±2,97	3,05±0,53	18,32±3,84	0	0	0,2±0,1	0,97±0,55
CD8	0,15±0,08	0,94±0,54	0,15±0,08	0,69±0,39	0	0	0	0
CD14	0,23±0,08	1,74±0,64	0,53±0,17	0,84±0,36	0	0	0	0
CD20	1,18±0,24	17,77±3,71	1,89±0,32	15,29±3,94	0	0	0,7±0,38	2±1,19
CD56	0,63±0,20	5,12±1,52	1,37±0,37	2,11±0,69	0,4±0,18	0,87±0,42	0	0
CD83	1,1±0,2	6,43±0,96	1,13±0,18	7,13±1,36	1±0,28	0,67±0,35	0,8±0,33	0,36±0,2

Таблица 4

Иммуногистохимическая характеристика клеток после терапии вакциной Аллоген

Слои кожи Клетки	Сосочковый слой		Сетчатый слой		Потовые железы		Сальные железы	
	Внесосудистая зона Периваскулярные пространства		Внесосудистая зона Периваскулярные пространства		M±m	%	M±m	%
	M±m	%	M±m	%				
CD3	4,6±0,95	15,57±3,08	10,3±2,61	14,64±2,98	11,55±3,83	5,6±1,66	9,75±3,55	4,26±1,49
CD8	1,27±0,33	1,73±0,36	4,6±0,85	7,22±1,38	0	0	4,05±0,88	4,07±1,37
CD14	0,4±0,15	0,67±0,29	2,1±0,55	3,32±1,38	0	0	0,5±0,25	0,45±0,28
CD20	2,23±0,47	9±2,0	2,48±0,57	6,66±1,5	0,3±0,12	0,5±0,22	0,7±0,25	1,01±0,36
CD56	2,1±0,36	5,07±0,94	2,3±0,37	5,7±1,09	0	0	2,05±0,45	3,18±0,79
CD83	1,45±0,27	5,2±1,09	1,7±0,33	5,17±0,93	0,12±0,06	0,24±0,14	0,4±0,13	0,7±0,24

Исследование гистологических срезов изучалось с помощью световой микроскопии при малом и большом увеличении.

Подсчет клеток проводился с помощью визирной сетки. Статистический анализ проводился с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Более детальный клеточный состав биоптатов исследовался посредством иммуногистохимического анализа с использованием моноклональных антител к Т-клеткам (CD3, CD8), моноцитам (CD14), В-клеткам (CD20), NK-клеткам (CD56), дендритным клеткам (CD83). Антитела производства Novocastra Laboratories.

Результаты

Изучены 24 препарата биоптатов кожи подлопаточной области до и после вакцинации, взятые у 12 пациентов (7 мужчин и 5 женщин), которым проведена терапия аутологичными дендритными клетками.

В полученных препаратах кожи пациентов в периваскулярных пространствах сосочкового слоя после вакцинации отмечалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества фибробластов и макрофагов и достоверное ($p < 0,05$) уменьшение количества фиброцитов, появление эозинофилов; периваскулярные пространства сетчатого слоя оставались без изменений (статистически достоверных различий не выявлено); в клеточном окружении потовых желез отмечалась тенденция ($p < 0,1$) к увеличению количества фибробластов, уменьшению количества деструкций; в клеточном окружении сальных желез отмечалась тенденция ($p < 0,1$) к уменьшению количества больших лимфоцитов и достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества деструкций.

Имуногистохимическое исследование было проведено на 16 препаратах биоптатов кожи подлопаточной области на материале, полученном до и после вакцинации.

На фоне проводимой вакцинации в периваскулярных пространствах сосочкового слоя отмечено достоверное ($p < 0,05$) уменьшение количества маркеров дендритных клеток (CD83) с тенденцией к увеличению количества NK-клеток (CD56); увеличение количества NK-клеток (CD56) в периваскулярных пространствах сетчатого слоя ($p < 0,05$) и тенденция к уменьшению количества Т-клеток (CD3; табл. 1–2). Клеточное окружение потовых сальных желез оставалось без динамики.

На фоне вакцинации модифицированными аллогенными опухолевыми клетками изучены 16 препаратов биоптатов кожи подлопаточной области, взятых у 3 мужчин и 5 женщин до и после вакцинации.

На фоне проводимой вакцинации в коже пациентов в периваскулярных пространствах сосочкового слоя отмечено достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества средних лимфоцитов и достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества больших, средних, малых лимфоцитов и макрофагов в сетчатом слое.

В окружении клеточного состава потовых желез отмечена тенденция ($p < 0,1$) к увеличению количества фиброцитов, средних лимфоцитов, макрофагов.

В окружении клеточного состава сальных желез отмечено достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества больших лимфоцитов, тенденция ($p < 0,1$) к увеличению количества плазмоцитов (рис. 1–3). Иммуногистохимические исследования 8 био-

птатов кожи подлопаточной области до и после вакцинации в периваскулярных пространствах сосочкового слоя показали достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества Т-клеток (CD3, CD8), В-клеток (CD20), NK-клеток (CD56).

Периваскулярные пространства сетчатого слоя также характеризовались достоверным ($p < 0,05$) увеличением количества CD3, CD8, CD14, CD56 маркеров.

В окружении клеточного состава потовых желез отмечено достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества Т-клеток (CD3); в окружении клеточного состава сальных желез отмечено достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества Т-клеток (CD3, CD8,) и NK (CD56) (табл. 3–4; рис. 4).

Обсуждение

По данным ряда авторов [3] кожа является высокоорганизованным периферическим органом, ассоциированным с иммунной системой, обладающим необходимым составом иммунных клеток, кооперативно взаимодействующих между собой при участии иммунорегуляторных цитокинов.

Согласно представлениям современных исследователей [3–5; 12], основными участниками иммунных реакций в кожных покровах являются клетки лимфоидного ряда и макрофагальные клетки. Ранее А. Chang и соавт. [14] изучали внутрикожную реакцию на введение дендритных клеток, нагруженных аутологичным опухолевым лизатом.

На фоне вакцинотерапии дендритными клетками отмечалось изменение клеточного состава иммунокомпетентных клеток в месте внутрикожного введения вакцины.

При световой микроскопии кожных биоптатов, окрашенных гематоксилином-эозином, в поверхностных слоях кожи отмечалась умеренная периваскулярная лимфоидная инфильтрация, при этом в более глубоких слоях кожи присутствовали более крупные периваскулярные и интерстициальные инфильтраты мононуклеарных клеток.

В воспалительном внутрикожном инфильтрате также присутствовали эозинофилы, дендритные и единичные плазматические клетки.

При иммуногистохимической характеристике клеточных инфильтратов было установлено, что они состоят из кожных дендритных клеток, лимфоцитарные скопления содержали преимущественно CD4 лимфоциты и в меньших количествах CD8 лимфоциты [14].

Наше исследование биоптатов показало, что при вакцинотерапии дендритными клетками больших диссеминированной меланомой появляются количественные изменения клеточных популяций в коже. При аллогенной вакцинации отмечается более выраженная лимфоидная инфильтрация, что может быть обусловлено развитием реакции «трансплантат против хозяина» или белковыми активациями цитокинов трансфицированных клеток.

Таким образом, внутрикожное введение противоопухолевых вакцин способствует увеличению количества иммунокомпетентных клеток (лимфоидных, NK, дендритных) в участках кожи, не затронутых введением вакцины, что может свидетельствовать об активации иммунной системы организма как в крови, так и в коже.

Иллюстрации 1–4 см. на стр. VI–VII

Выводы

1. Внутрικοжная вакцинация генно-инженерной вакциной «Аллоген» приводит к активации иммунных механизмов защиты кожи, проявляющейся в увеличении количества иммунокомпетентных клеток (больших, средних, малых лимфоцитов, макрофагов, плазмоцитов) в различной степени выраженности в различных областях кожи, в основном в периваскулярных пространствах сетчатого слоя. При иммуногистохимическом исследовании выявляется достоверное увеличение количества CD3 маркеров во всех областях кожи, увеличение CD8, CD56 везде за исключением окружения потовых желез, увеличение CD20 сосочкового и CD14 маркеров сетчатого слоя в периваскулярных пространствах.
2. В процессе вакцинотерапии пациентов с диссеминированной меланомой дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом, отмечается сдвиг в пользу фибробластов в соотношении между клетками фиброидного ряда в периваскулярных пространствах сосочкового слоя, а также умеренно выраженная эозинофилия; в окружении сальных желез увеличивается количество деструктивных клеток. При иммуногистохимическом исследовании выявляется достоверное увеличение CD56 маркеров в периваскулярных пространствах сетчатого слоя, тенденция к увеличению их в периваскулярных пространствах сосочкового слоя, уменьшение CD83 маркеров в периваскулярных пространствах сосочкового слоя, CD3 маркеров в периваскулярных пространствах сетчатого слоя. В окружении потовых и сальных желез статистически значимых изменений не отмечается.

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

Литература

1. Бархина Т.Г., Пархоменко Ю.Г. Морфологическая характеристика клеток эпидермиса при ВИЧ // Архив патологии. – 1996. – № 5. – С. 64–7.
2. Белецкая Л.В., Беренбейн Б.А. Сходство эпителиальных клеток и эпителия тимуса // Вестник дерматологии. – 1986. – № 8. – С. 15–21.
3. Вавилов А.М., Лезвинская Е.М. Иммунокомпетентные структуры кожи их роль в развитии первичных кожных лимфом // Архив патологии. – 1996. – № 6. – С. 7–12.
4. Гантневская Ю.А., Селявко В.В. Дендритные клетки: роль в системе иммунитета // Иммунопатология, аллергология и инфектология. – 2001. – № 4. – С. 5–19.
5. Зимина И.В., Лопухин Ю.М. Кожа, как иммунный орган // Иммунология. – 1994. – № 6. – С. 8–12.
6. Кашутин С.Л. Соотношение параметров иммунных реакций в коже и периферической крови. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Архангельск, 1998.
7. Кошевенко Ю.Н. Механизмы клеточного иммунитета в коже // Косметика и медицина. – 2001. – № 3. – С. 15–26.
8. Марголина А. Защитные системы кожи и косметические средства // Косметика и медицина. – 2002. – № 3. – С. 8–20.
9. Сергеев А.Ю., Караулов А.В., Сергеев Ю.В. Иммунодерматология: иммунологические основы патогенеза воспалительных дерматозов человека // Иммунопатология, аллергология и инфектология. – 2003. – № 3. – С. 10–23.
10. Фролов Е.П., Персина И.С., Лезвинская Е.М. О значении лимфоидных образований кожи в иммуногенезе // Вестник дерматологии и венерологии. – 1988. – № 1. – С. 29–34.
11. Шишкова И.В., Авакян А.Р. Иммунные реакции кожи и ассоциированных с ней лимфатических узлов // Актуальные вопросы дерматовенерологии. – Курск, 2000. – Вып. 3. – С. 157–60.
12. Braathen L.R. The role of Langerhans cell in HIV-infection // The XXIII Congress Of The Polish Dermatologic Society, Wroclaw 14.09–16.09 1989, Summaries. – P.5.
13. Braathen L.D. The role of human epidermal LC in skin immunity // Derm. Beruf. Umwelt. – 1987. – 35(2). – P. 58–61.
14. Chang A., Redman B., Whitfield J. et al. A Phase I Trial of Tumor Lysate-pulsed Dendritic Cells in the Treatment of Advanced Cancer // Clinical Cancer Research. – 2002. – 8. – P. 1021–32.

(окончание)

Логинава 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

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006.04-085.831:615.37

*Н.В. Кудинова, Т.Т. Березов***ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ:
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ЛЕЧЕНИЯ**

Российский университет дружбы народов, Москва

Контактная информация*Березов Темирболат Темболатович – академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии медицинского факультета Российского университета дружбы народов***адрес:** 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8; **тел./факс:** +7(495)434-04-12**e-mail:** berезov@med.rudn.ru

Статья поступила: 19.06.2009, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей – принципиально новый метод лечения, переживает сегодня бурное развитие. Преимущества ФДТ перед химио- и радиотерапией в высокой селективности поражения опухолевой ткани, а также в отсутствии тяжелых местных и системных осложнений. Принцип метода основан на способности фотосенсибилизаторов селективно накапливаться в ткани опухолей и при локальном воздействии облучения определенной длины волны генерировать синглетный кислород или кислородосодержащие свободные радикалы, что приводит к гибели опухолевых клеток. Помимо прямого цитотоксического действия на клетки, ФДТ также нарушает кровообращение в опухоли и провоцирует иммунную реакцию. Последней факт был взят на вооружение при создании комбинационной фотоиммунотерапии. В настоящей статье собраны последние научные данные о механизмах иммунного ответа при ФДТ, описаны результаты комбинационной фотодинамической и иммунной терапии, принципы создания противоопухолевых вакцин.

Ключевые слова: злокачественная опухоль, фотодинамическая терапия, иммунотерапия, иммунная реакция.*N.V. Kudinova, T.T. Berezov***PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER:
IMMUNOLOGICAL APPROACH OF TREATMENT**

Russian People's Friendship University, School of Medicine, Moscow

Abstract

Photodynamic therapy is a clinically approved therapeutic modality used for the management of several types of tumors. In contrast to radiotherapy and chemotherapy, PDT is selectively destroyed the tumor without any toxic effects on normal tissues. Photosensitizers are known to accumulate in tumor and generate the reactive oxygen species after exposure to harmless light to kill malignant cells by apoptosis and/or necrosis, shut down the tumor vasculature and stimulate the host immune system. This review summarizes the influence of PDT on the immune response and discusses different immunotherapeutic approaches which can be used to improve effectiveness and extend the applications of PDT in clinic.

Key words: cancer, photodynamic therapy, immunotherapy, immune response.**Введение**

Основные принципы ФДТ были впервые опубликованы более ста лет назад [55]. Метод основан на способности фотосенсибилизаторов селективно накапливаться в ткани опухолей и при локальном воздействии лазерного облучения определенной λ генерировать свободные радикалы, вызывающие гибель опухолевых клеток. ФДТ активизирует различные механизмы, приводящие к разрушению опухолевой ткани [6; 17]. Свободные радикалы и продукты их окисления оказывают прямое цитотоксическое действие на клетки, вызывая их гибель путем некроза или апоптоза [66]. ФДТ влияет на сосуды опухоли, приводя к их спазму и разрушению, нарушая тем самым питание опухоли [48], и вызывает значительную стимуляцию иммунной системы [5; 40; 85]. Большинство существующих на данный момент методов опухоле-

вой терапии оказывают иммуносупрессивное действие. Известно, что полостная операция по удалению опухоли приводит к подавлению иммунной системы, что выражается в уменьшении количества лимфоцитов и НК [11; 64]. В ХТ и ЛТ используют дозы необходимые для разрушения опухолевых клеток, в то же время эти дозы токсичны для клеток костного мозга, где вырабатываются клетки иммунной системы. Нейтропения – одно из частых осложнений после этих видов терапии [13; 24].

Механизм действия ФДТ принципиально отличается от такового других методов противоопухолевой терапии. Прямое цитотоксическое действие на клетки опухоли и сосуды сопровождается выеюким иммунологическим ответом, который выражается в экспрессии белков теплового шока, инфильтрации опухоли-лейкоцитами и макрофагами и презентации антигенов опухоли Т-лимфоцитам.

В идеале противораковая терапия должна быть направлена не только на разрушение раковых клеток, но и на стимуляцию иммунной системы таким образом, чтобы поражались оставшиеся раковые клетки – как в первичном очаге, так и в отдаленных метастазах. С этой точки зрения ФДТ обладает всеми необходимыми свойствами.

В настоящем обзоре обсуждаются механизмы иммунной реакции опухоли в ответ на ФДТ, рассмотрены последние данные о возможностях комбинированной ФДТ с иммуностимуляторами.

Механизмы действия ФДТ

Известно, что существуют три механизма деструкции опухоли в процессе ФДТ:

1. Свободные радикалы и продукты окисления оказывают прямое цитотоксичное действие на опухолевые клетки,
2. Происходит нарушение кровообращения,
3. Активируются иммунные реакции, направленные на разрушение клеток опухоли.

Попадая в кровоток после внутривенного введения, фотосенсибилизатор, в зависимости от свойств, может связываться с липопротеинами и в составе комплексов транспортироваться к опухолевым клеткам [38]. За счет повышенной проницаемости сосудов опухоли и плазматических мембран самих опухолевых клеток происходит накопление сенсибилизатора в опухолевой ткани.

Локализация и распределение сенсибилизатора в тканях и опухолях зависит от многих факторов, среди которых гидрофобность, рН, лимфатический дренаж и связывание с липопротеинами [38]. На локализацию в самих опухолевых клетках оказывают влияние агрегационное состояние сенсибилизатора, молекулярный заряд и мембранный потенциал опухолевых клеток.

Проникая внутрь клетки путем эндоцитоза или диффузии, сенсибилизатор может локализоваться в митохондриях, лизосомах, плазматической мембране или ядре [38; 68].

Вторая составляющая ФДТ – световое облучение. Молекула сенсибилизатора переходит в возбужденное состояние, далее при наличии кислорода происходит цепь реакций с образованием свободных радикалов и синглетного кислорода. Последний окисляет ненасыщенные липиды в составе плазматических мембран, аминокислоты в составе белков и другие молекулы, что приводит к нарушениям проницаемости мембраны, потере эластичности, кросслинкованию аминокислот и полипептидов, инактивации мембрано-ассоциированных ферментов и рецепторов [29].

Вторая составляющая механизма деструкции новообразования – нарушение кровоснабжения опухолевой ткани. Васкулярный эффект был описан для ряда сенсибилизаторов, таких как Фотофрин 2, пурпурины, фталокцианаты, Нреб [56; 63; 69; 70]. Прямой цитотоксичный эффект ФДТ на эндотелиальные клетки сопровождается вазоконстрикцией, оголением базальной мембраны и кровоизлиянием, что, в конечном итоге, ведет к отеку, агрегации тромбоцитов, образованию тромбов, освобождению тромбоксанов и активации (рис. 1) системы комплемента [23; 48].

Более того, на начальных этапах ФДТ в зависимости от типа фотосенсибилизатора может ингибировать освобождение NO из эндотелиальных клеток, усиливая тем самым эффект вазоконстрикции [28]. Последняя приводит к ишемии опухоле-

вой ткани, вызывая гибель клеток. Различные фотосенсибилизаторы отличаются по механизмам действия на сосуды опухоли.

Так, ФДТ с некоторыми фотосенсибилизаторами может вызывать коллапс сосудов на длительное время, в других случаях было отмечено восстановление кровообращения в опухоли сразу после прекращения облучения. Этот поздний эффект скорее всего объясняется освобождением сосудорасширяющих медиаторов – NO, гистамина, простагландинов [23].

В ишемических областях опухолевой ткани происходит каскад химических реакций. С одной стороны – реакция перевода гипоксантина в ксантин, в результате чего освобождается большое количество свободных радикалов, основной из которых супероксид-анион. Эти молекулы оксидативного стресса способствуют активации системы комплемента и инфильтрации области ишемии нейтрофилами и другими клетками иммунной системы [72]. С другой стороны, тромбоциты также могут активировать каскад системы комплемента, играющего важную роль в запуске иммунологического ответа на ФДТ, поскольку продукты распада компонентов системы комплемента C3a и C5a являются хемоаттрактантами и, в свою очередь, также активируют нейтрофилы, макрофаги, Т-лимфоциты [16].

Нейтрофилы являются [6; 50] первыми клетками, которые инфильтрируют в опухолевую ткань (см. рис. 1). Увеличению нейтрофилов в крови способствуют индуцированные ФДТ: интерлейкины (IL-1 β , IL-6, IL-10), компонент системы комплемента C5a, ФНО, G-CSF, тромбоксаны, лейкотриены, гистамин, простагландин E₂ и цитокин KC [7]. Аггезия нейтрофилов на стенке сосудов наблюдается уже через 5 минут после начала ФДТ [21]. Миграция нейтрофилов к опухоли регулируется цитокинами: E-selectin, MIP-2, KC [33; 74]. Более того, нейтрофилы сами служат источником хемоаттрактантов и иммунорегуляторных факторов, необходимых для прогрессирования иммунного ответа [39]. Деплеция нейтрофилов приводит к снижению эффективности ФДТ [14; 43]. К снижению процента выздоровления приводило также блокирование медиаторов нейтрофилии, таких как рецепторы системы комплемента, IL-1, IL-6, тромбоксан, гистамин [15; 22; 74]. С другой стороны, введение G-CSF [31] или GM-CSF [51] увеличивало накопление нейтрофилов в опухоли и улучшало эффективность ФДТ.

Также было показано, что под действием ФДТ увеличивается инфильтрация опухоли макрофагами [71]. Макрофаги, выделенные из карциномы, пролеченной с помощью ФДТ, в 5 раз более эффективно уничтожали клетки опухоли, по сравнению с макрофагами, выделенными из интактной опухоли. Роль макрофагов в процессе ФДТ была доказана экспериментами *in vivo*.

Так было показано, что введение мышам silica, которая инактивирует макрофаги, снижало эффективность ФДТ [43]. Наоборот, введение стимулирующих макрофаги факторов, таких как GM-CSF и витамин D₃ связывающий белок фактора активатора макрофагов (DBPMAF), приводило к увеличению процента выздоровлений [41; 42; 51].

Развитие иммунной реакции в ответ на ФДТ

В результате исследований на клеточных культурах опухолевых клеток было обнаружено, что ФДТ вызывает гибель опухолевых клеток как путем апоптоза, так и путем некроза [5].

Баланс между клетками, запрограммированными на гибель путем апоптоза или некроза, в условиях *in vitro* зависит от нескольких параметров: дозы фотосенсибилизатора, внутриклеточной локализации фотосенсибилизатора, дозы светового облучения, концентрации кислорода и типа клеток [66].

Гибель клеток путем апоптоза после ФДТ была показана и в экспериментах *in vivo* [8; 37; 54]. Во многих исследованиях ставилась задача найти взаимосвязь между механизмом гибели клеток и эффективностью иммунного ответа [2; 57]. Полученные данные несут противоречивый характер. В некоторых исследованиях было показано, что сила иммунного ответа на апоптозные клетки выше, чем на некрозные [75; 76]. Другие результаты показывают, что более эффективно активируют иммунную систему те методы терапии, которые индуцируют гибель клеток по типу некроза, поскольку в этом случае происходит разрушение плазматической мембраны и содержимое цитозоля попадает во внеклеточное пространство, провоцируя иммунный ответ [58; 89]. В случае апоптоза плазматическая мембрана клеток не разрушается.

Начало иммунной реакции в ответ на ФДТ сопровождается захватом опухолевого антигена незрелыми дендритными клетками (см. рис. 1). Этот процесс может проходить тремя различными путями: фагоцитоз апоптозных клеток, захват фрагментов некрозных клеток или представление антигена в комплексе с внеклеточным белком теплового шока 70 (hsp70). Было показано, что уровень mRNA белка hsp70 увеличивается после ФДТ с такими фотосенсибилизаторами, как Фотофрин, этиопурпурин и Foscan [34; 59; 73]. HSP70 образует стабильные комплексы с цитоплазматическими антигенами опухолевых клеток [88]. Затем HSP70 связывается с рецепторами на поверхности дендритных клеток, что приводит к их активации и созреванию. Зрелые дендритные клетки мигрируют в лимфатические узлы, где они представляют опухолевые антигены в комплексе с молекулами класса I и II МНС Т-лимфоцитам: цитотоксичным CD8⁺ и хелперам CD4⁺ [65; 81]. Для эффективной активации Т-лимфоцитов требуется наличие трех сигналов: распознавание антигенов, стимулирующие сигналы, доставляемые молекулами CD28, OX40, 4-1BB и освобождение цитокинов [18]. Цитокины играют важную роль в определении типа иммунного ответа, который развивается после представления антигена. Лимфоциты Т-хелперы дифференцируются на Th1, Th2 и другие подклассы [60]. Клетки Th1 посредством секреции различных факторов: IL-2, интерферона γ (IFN γ) и TNF определяют развитие клеточно-опосредованного иммунного ответа, который включает в себя активность CD8⁺ Т-лимфоцитов, макрофагов и NK. Клетки Th2 посредством секреции IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 отвечают за гуморальный иммунный ответ.

Другие подклассы Т-лимфоцитов (Th3, Tr1) секретируют IL-10, фактор роста опухоли β (TGF- β) и другие цитокины, отвечающие за силу иммунного ответа [12]. Активированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты мигрируют из лимфатических узлов к опухоли. Клетки CD8⁺ непосредственно уничтожают опухолевые клетки, CD4⁺ действуют опосредованно через другие клетки иммунной системы (NK и макрофаги).

Эксперименты с трансгенными животными, дефицитными по CD8⁺, CD4⁺ или NK, показали, что в первичном ответе на ФДТ такие животные не отличались от нормальных, однако у них отмечался вторичный рост опухоли после лечения [27; 43]. Эксперименты по деплеции популяции Т-лимфоци-

тов показали, что главную роль в уничтожении опухоли играют CD8⁺ клетки, тогда как CD4⁺ выполняют функцию поддержания [44].

Иммунный ответ после ФДТ распространяется не только на область первичного очага опухоли, но и на метастазы [9]. Облучение с ФДТ первичного очага привитой опухоли у крыс приводило к исчезновению очагов метастазов. Клинический случай регрессии опухоли в необлученных очагах ангиосаркомы наблюдался, если только один очаг опухоли был облучен с помощью ФДТ. Биопсия необлученных очагов показала массивную инфильтрацию Т-лимфоцитов [82].

Было высказано предположение, что реакция иммунной системы после ФДТ имеет продолжительное действие. Так, было обнаружено, что вторично-привитая опухоль не вырастает у животных, вылечившихся после ФДТ [9; 67]. Более того, иммунологическая память может передаваться с помощью адаптивного переноса иммунных клеток. Развитие опухоли не происходило, если предварительно мышам были посажены Т-клетки (CD8⁺, CD4⁺), выделенные из селезенки мышей через 3 месяца после ФДТ [67]. Если же подсаживали лимфоциты от мышей, вылечившихся с помощью радиотерапии, результаты были менее эффективными [44; 53]. Полученные результаты позволяют предположить развитие иммунологической памяти в ответ на ФДТ.

Комбинирование ФДТ с иммунотерапией

Метод комбинированного лечения ФДТ с иммунотерапией (рис. 2) называется фотоиммунотерапией (ФИТ). В последнее время этому методу уделяется много внимания, поскольку цитотоксический эффект фотодинамической терапии может быть усилен за счет стимулирующего действия иммунотерапии.

Один из видов ФИТ основывается на создании конъюгатов фотосенсибилизаторов и моноклональных антител, специфичных к антигенным детерминантам опухолевых клеток. Так, Governatore et al. успешно использовал в экспериментах ФДТ на крысах конъюгат хлорина е6/Mab17.1A. Процент выздоровления от опухоли при использовании такого комбинированного фотосенсибилизатора был статистически более высоким по сравнению с ФДТ только с фотосенсибилизатором или иммунотерапией с антителами [35]. Другие авторы использовали в своих работах различные конъюгаты фотосенсибилизаторов (aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate (AlPcS4), meta-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC), pheophorbide a (PPa), chlorine e6) с моноклональными антителами (C225, U36, 425, E48, HER50, HER66) [30; 35; 61; 77; 86; 87]. В экспериментах *in vitro* с использованием этих конъюгатов были достигнуты положительные результаты. Однако следует отметить, что практическое применение ФИТ имеет определенные трудности.

Большинство фотосенсибилизаторов гидрофобны, что создает некоторые технические проблемы в процессе конъюгации [77; 86]. Поскольку конъюгаты имеют больший размер, они менее проходимы в участках опухоли с бедным кровоснабжением [86; 87]. Было предложено использовать комбинацию антиангиогенной и фотодинамической терапии [19; 26]. Введение после ФДТ таких моноклональных антител как Avastin (bevacizumab) против VEGF, MF1 и DC101 против рецепторов VEGF повышало эффективность ФДТ [4; 20].

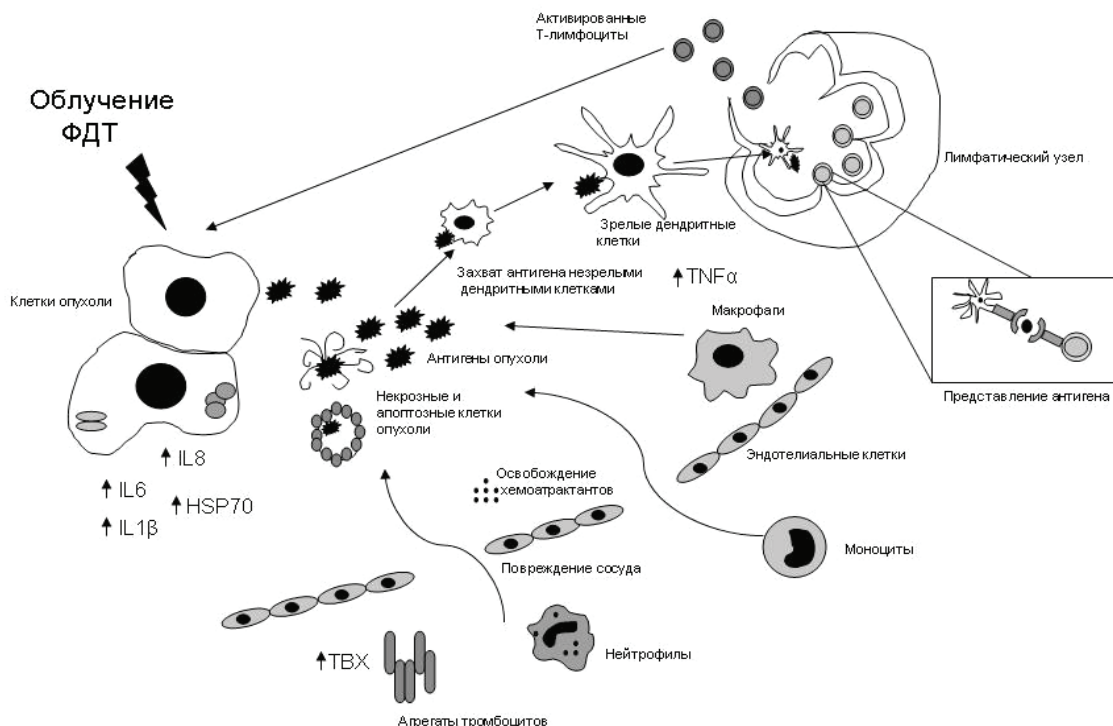


Рис. 1. Иммунная и сосудистая реакция в ответ на ФДТ.

ФДТ оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки, вызывая их гибель по типу некроза или апоптоза. Апоптотические и некротические клетки экспрессируют белок теплового шока (HSP70). Опухолевый антиген захватывается незрелыми дендритными клетками фагоцитозом или в комплексе с HSP70. Созревание дендритных клеток происходит под действием освобождающихся цитокинов. Зрелые дендритные клетки мигрируют в лимфатические узлы, где представляют антиген Т-лимфоцитам. Активированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты под действием цитокинов направляются к клеткам опухоли и уничтожают их. Под действием ФДТ происходит разрушение эндотелиальных клеток, что приводит к вазоконстрикции/дилатации, агрегации тромбоцитов, освобождению тромбоксана (TBX) интерлейкинов: IL1β, IL6, IL8, фактора некроза опухоли (TNFα) и инфильтрации опухоли нейтрофилами, моноцитами и макрофагами (адоптировано из [6]).

Цит. no: Castano A. et al., с изменениями.



Рис. 2. Комбинация ФДТ с различными методами иммунотерапии.

Второй вид ФИТ – использование иммуностимуляторов в сочетании с ФДТ. В качестве иммуностимуляторов было предложено использовать компоненты бактерий [78]. Начиная с 1960-х гг. в качестве иммуностимулятора для лечения РМП используется BCG, полученная из *Myc. bovis* [3].

Комбинация BCG с ФДТ приводит к увеличению количества Т-клеток памяти в лимфатических узлах и, как следствие, увеличивает процент выздоровления [45]. В литературе [10; 42; 49; 62; 84] описаны эксперименты комбинированной терапии, где в качестве иммуностимуляторов использовали:

- *Propionibacterium acnes*;
- экстракт клеточной мембраны *Mycobacterium*;
- OK432, выделенной из *Streptococcal bacteriae*;
- *schizophyllan* (β -D-glucan fungal polysaccharide);
- *glycated chitosan* (экстракт из панциря креветки).

Введение этих препаратов до или после ФДТ в несколько раз увеличивало процент выздоровления от опухоли. Полагают, что функция иммуностимуляторов заключается в активации Toll-like рецепторов (TLR) [83]. Активация TLR рецепторов приводит к активации дендритных клеток, увеличению презентации антигена, а также к запуску каскада реакций, конечной из которых является индукция экспрессии генов, в том числе NF κ B, отвечающих за иммунный ответ [79]. В настоящее время около 13 TLR было идентифицировано на поверхности моноцитов, макрофагов, дендритных клеток [36; 52].

Принципиально новый подход – комбинация ФДТ и адоптивной клеточной терапии. Внутриопухолевое введение незрелых дендритных клеток животным с последующим облучением с фотосенсибилизатором (Фотофрин или chlorine-type PS) повышало эффективность ФДТ [25; 80].

Более того, если животному прививали две опухоли, но комбинированному лечению ФДТ с дендритными клетками подвергали только одну из опухолей, то необработанная опухоль регрессировала [80]. Объяснение этому результату попытались найти в своей работе Golab et al., которые показали, что при комбинированном лечении дендритными клетками и ФДТ происходила стимуляция NK-клеток [31]. Адоптивный перенос NK-клеток, генетически измененных для продукции IL2, непосредственно перед ФДТ приводил к двукратному повышению процента выздоровления от опухоли у мышей, по сравнению с адоптивным переносом неизмененных NK клеток [46]. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что комбинирование фотодинамической и иммунной терапии повышает эффективность лечения и вызывает резистентность к повторному привитию опухоли.

Литература

1. Bae S.M., Kim Y.M., Kwak S.Y. et al. Photodynamic therapy-generated tumor cell lysates with CpG-oligodeoxynucleotide enhance immunotherapy efficacy in human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells // *Cancer. Sci.* 2007. – Vol. 98. – P. 747–52.
2. Bartholomae W.C. T cell immunity induced by live, necrotic and apoptotic tumor cells // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173. – P. 1012–22.
3. Bassi P. BCG (Bacillus of Calmette Guerin) therapy of high risk superficial bladder cancer // *Surg Oncol.* – 2002. – Vol. 11. – P. 77–83.
4. Bhuvanewari R., Yuen G., Chee S. et al. Hypericin-mediated photodynamic therapy in combination with Avastin (bevacizumab) improves tumor response by downregulating angiogenic proteins // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – Vol. 6. – P. 1275–83.
5. Canti G., De Simone A., Korbelik M. Photodynamic therapy and the immune system in experimental oncology // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – Vol. 1. – P. 79–80.

Создание противоопухолевой вакцины с помощью ФДТ

В основе создания противоопухолевой вакцины лежит иммуностимулирующий эффект ФДТ. Gollnik et al. [32] сравнивали противоопухолевый потенциал вакцин, полученных из клеточных лизатов опухолевых клеток EMT6 и P815. Клетки в одном случае облучали УФ, в другом – ионизирующей радиацией и в третьем – в присутствии фотосенсибилизатора. Вакцины, полученные из клеток, обработанных ФДТ, были специфичны к опухоли, увеличивали продукцию Т-лимфоцитов, стимулировали созревание дендритных клеток и экспрессию IL12 в отличие от клеток, облученных другими методами.

В другой работе Korbelik M. et al. [47] получили вакцину из опухолевых клеток SCCVII, облученных ФДТ, а затем рентгеновскими лучами. Внутриопухолевое введение таких клеток мышам приводило к регрессии опухоли и выздоровлению. Описанные выше результаты нашли свое подтверждение и в других работах [1; 90]. Было высказано предположение, что использование вакцины, полученной посредством ФДТ, в качестве иммуностимулятора во вспомогательной иммунотерапии имеет высокий потенциал в будущем.

Заключение

История ФДТ насчитывает не один десяток лет. В последнее время детальное изучение механизмов действия показало, что помимо прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки ФДТ имеет антивазкулярный и иммуностимулирующий эффект. Реакция иммунной системы в ответ на ФДТ выражается в инфильтрации опухоли нейтрофилами и макрофагами и сопровождается освобождением цитокинов и медиаторов. Активация Т-лимфоцитов приводит к уничтожению оставшихся опухолевых клеток.

В экспериментах на животных и клеточных культурах было показано, что комбинация фотодинамической терапии и иммунотерапии значительно повышает эффективность лечения и увеличивает процент случаев выздоровления. К сожалению, эксперименты не выходят пока за рамки лаборатории. Были опубликованы только единичные случаи клинических испытаний комбинационной фото- и иммунотерапии.

Понимание механизмов влияния ФДТ на иммунную систему и умелое применение этих знаний на практике позволит вылечивать не только локальные опухоли, но и предотвращать формирование метастазов.

6. *Castano A., Mroz P., Hamblin M.* Photodynamic therapy and anti-tumor immunity // *Nature Rev. Cancer.* – 2006. – Vol. 6. – P. 535–45.
7. *Cecic I., Korbelik M.* Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors // *Cancer.* – 2003. – Vol. 278. – P. 407–14.
8. *Chen B.* Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model // *Int. J. Cancer.* – 2002. – Vol. 98. – P. 284–90.
9. *Chen W.R., Zhu W.G., Dynlacht J.R.* Long-term tumor resistance induced by laser photo-immunotherapy // *Int. J. Cancer.* – 1999. – Vol. 81. – P. 808–12.
10. *Chen W.* Enhancement of laser cancer treatment by a chitosan-derived immunoadjuvant // *Photochem. Photobiol.* – 2005. – Vol. 81. – P. 190–5.
11. *Cole W.H., Humphrey L.* Need for immunologic stimulators during immunosuppression produced by major cancer surgery // *Ann. Surg.* – 1985. – Vol. 202. – P. 9–20.
12. *Cottrez F., Groux H.* Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells // *Transplantation.* – 2004. – Vol. 77. – P. S12–5.
13. *Crum E.D.* Effect of cisplatin upon expression of in vivo immune tumor resistance // *Cancer Immunol. Immunother.* – 1993. – Vol. 36. – P. 18–24.
14. *de Vree W., Essers M., Bruijn H., Sluiter W.* Evidence for an important role of neutrophils in the efficacy of photodynamic therapy in vivo // *Cancer Res.* – 1996. – Vol. 56. – P. 2908–11.
15. *de Vree W., de Bruijn H., Kraak-Slee G. et al.* The effect of thrombocytopenia on the efficacy of Photofrin-based photodynamic therapy in vivo // *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* – 2001. – Vol. 4146. – P. 79–85.
16. *Del Conde I., Cruz M.A., Zhang H., Lopez J.* Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201. – P. 871–9.
17. *Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K.* Photodynamic therapy of cancer // *Nature Rev. Cancer* – 2003. – Vol. 3. – P. 380–7.
18. *Dunn G.P., Old L., Schreiber R.* The three Es of cancer immunoeediting // *Ann. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 329–60.
19. *Ferrario A., Tiehl N., Rucker N. et al.* Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 4066–9.
20. *Ferrario A., Gomer C.* Avastin enhances photodynamic therapy treatment of Kaposi's sarcoma in mouse tumor model // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* – 2006. – Vol. 25. – P. 251–9.
21. *Fingar V., Wieman T., Wiehle S., Cerrito P.* The role of microvascular damage in photodynamic therapy: The effect of treatment on vessel constriction, permeability and leukocyte adhesion // *Cancer Res.* – 1992. – Vol. 52. – P. 4914–21.
22. *Fingar V., Siegel K., Wieman T., Doak K.* The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy // *Photochem. Photobiol.* – 1993. – Vol. 58. – P. 393–9.
23. *Fingar V., Taber S., Haydon P. et al.* Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in preclinical and clinical models at the University of Louisville // *In vivo.* – 2000. – Vol. 14. – P. 93–100.
24. *Friedman E.J.* Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy // *Curr. Pharm. Des.* – 2001. – Vol. 8. – P. 1765–80.
25. *Jalili A.* Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells // *Clin. Cancer. Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 4498–508.
26. *Jiang R., Zhang X., Kalkanis S. et al.* Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma // *Photochem. Photobiol.* – 2008. – Vol. 84. – P. 128–37.
27. *Hendrzak-Henion J., Knisely T., Cincotta L.* Role of the immune system in mediating the antitumor effect of benzophenothiazina photodynamic therapy // *Photochem. Photobiol.* – 1999. – Vol. 69. – P. 575–81.
28. *Gilissen M., Star W., Koster J.F., Sluiter W.* Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas // *Cancer Res.* – 1993. – Vol. 53. – P. 2548–52.
29. *Girotti A.* Photodynamic lipid peroxidation in biological systems // *Photochem. Photobiol.* – 1990. – Vol. 51. – P. 497–509.
30. *Goff B., Blake J., Bamberg M., Hasan T.* Treatment of ovarian cancer with photodynamic therapy and immunoconjugates in murine ovarian cancer model // *Br. J. Cancer.* – 1996. – Vol. 74. – P. 1194–8.
31. *Golab J., Wilczynski G., Zagodzón R. et al.* Potentiation of the anti-tumor effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF // *Br. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 82. – P. 1485–91.
32. *Gollnick S., Vaughan L., Henderson B.* Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 1604–8.
33. *Gollnick S., Evans S., Baumann H.* Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation // *Br. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 88. – P. 1772–9.
34. *Gomer C.* Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins // *Cancer Res.* – 1996. – Vol. 56. – P. 2355–60.

35. *Governatore M., Hamblin M., Shea C. et al.* Experimental photoimmunotherapy of hepatic metastasis of colonrectal cancer with a 17.1A chlorin (e6) immunoconjugate // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 4200–5.
36. *Kadowaki N.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 194. – P. 863–9.
37. *Kaneko T., Chiba H., Yasuda T., Kusama K.* Detection of photodynamic therapy-induced early apoptosis in human salivary gland tumor cells in vitro and in mouse tumor model // *Oral. Oncol.* – 2004. – Vol. 40. – P. 787–92.
38. *Kessel D., Thompson P., Nantwik K.* Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine // *Photochem. Photobiol.* – 1987. – Vol. 45. – P. 787–90.
39. *Kobayashi W., Liu Q., Matsumiya T.* Photodynamic therapy upregulates expression of Mac-1 and generation of leukotriene B (4) by human polymorphonuclear leukocytes // *Oral. Oncol.* – 2004. – Vol. 40. – P. 506–10.
40. *Korbelik M.* Induction of tumor immunity by photodynamic therapy // *J. Clin. Laser. Med. Surg.* – 1996. – Vol. 14. – P. 329–34.
41. *Korbelik M., Naraparaju V., Yamamoto M.* Macrophage-directed immunotherapy as adjuvant to photodynamic therapy of cancer // *Br. J. Cancer.* – 1997. – Vol. 75. – P. 202–7.
42. *Korbelik M., Cecic I.* Enhancement of tumor response to photodynamic therapy by adjuvant mycobacterium cell-wall treatment // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1998. – Vol. 44. – P. 151–8.
43. *Korbelik M., Cecic I.* Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy // *Cancer. Lett.* – 1999. – Vol. 137. – P. 91–8.
44. *Korbelik M., Dougherty G.* Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 1941–6.
45. *Korbelik M., Sun J., Posakony J.* Interaction between photodynamic therapy and BCG immunotherapy responsible for the reduced recurrence of treated mouse tumors // *Photochem. Photobiol.* – 2001. – Vol. 73. – P. 403–9.
46. *Korbelik M., Sun J.* Cancer treatment by photodynamic therapy combined with adoptive immunotherapy using genetically altered natural killer cell line // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 93. – P. 269–74.
47. *Korbelik M., Sun J.* Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy // *Cancer. Immunol. Immunother.* – 2005. – Vol. 55. – P. 900–9.
48. *Krammer B.* Vascular effects of photodynamic therapy // *Anticancer Res.* – 2001. – Vol. 21. – P. 4271–7.
49. *Krosz G., Korbelik M.* Potentiation of photodynamic therapy by immunotherapy: effect of schizophyllan (SPG) // *Cancer. Lett.* – 1994. – Vol. 84. – P. 43–9.
50. *Krosz G., Korbelik M., Dougherty G.* Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumor by photofrin-based photodynamic therapy // *Br. J. Cancer.* – 1995. – Vol. 71. – P. 549–55.
51. *Krosz G., Korbelik M., Krosz J., Dougherty G.* Potentiation of photodynamic therapy elicited anti-tumor response by localized treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Cancer Res.* – 1996. – Vol. 56. – P. 3281–6.
52. *Krug A.* Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12 // *Eur. J. Immunol.* – 2001. – Vol. 31. – P. 3026–37.
53. *Lugade A.A.* Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 7516–23.
54. *Lilge L., Portnoy M., Wilson B.C.* Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumor tissue // *Br. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 83. – P. 1110–17.
55. *Moan J., Peng Q.* An outline of the hundred-year history of PDT // *Anticancer Res.* – 2003. – Vol. 23. – P. 3591–600.
56. *Morgan A., Garbo G., Keck R. et al.* Metalloporphyrins and light effect on transplantable rat bladder tumors and murine skin // *Photochem. Photobiol.* – 1990. – Vol. 51. – P. 589–92.
57. *Magner W.J., Tomasi T.B.* Apoptotic and necrotic cells induced by different agents vary in their expression of MHC and costimulatory genes // *Mol. Immunol.* – 2005. – Vol. 42. – P. 1033–42.
58. *Melcher A., Gough M., Todryk S., Vile R.* Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name? // *J. Mol. Med.* – 1999. – Vol. 77. – P. 824–33.
59. *Mitra S., Goren E., Frelinger J.* Activation of heat shock protein 70 promoter with meso-tetrahydroxyphenyl chlorine photodynamic therapy reported by green fluorescent protein in vitro and in vivo // *Photochem. Photobiol.* – 2003. – Vol. 78. – P. 615–22.
60. *Mazzoni A., Segal D.* Controlling the Toll road to dendritic cell polarization // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – Vol. 75. – P. 721–30.
61. *Mew D., Wat C.K., Towers G. et al.* Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates // *J. Immunol.* – 1983. – Vol. 130. – P. 1473–7.
62. *Myers R.* Modulation of hematoporphyrin derivative-sensitized phototherapy with *Corynebacterium parvum* in murine transitional cell carcinoma // *Urology.* – 1989. – Vol. 33. – P. 230–5.

63. Nelson J., Liaw I., Orenstein A. et al. Photodynamic therapy of human malignant melanoma xenografts in athymic nude mice // J. Natl. Cancer Inst. – 1988. – Vol. 80. – P. 1599–1605.
64. Ng C.S. Thoracotomy is associated with significantly more profound suppression in lymphocytes and natural killer cells than video-assisted thoracic surgery following major lung resections for cancer // J. Invest. Surg. – 2005. – Vol. 18. – P. 81–8.
65. Nowis D., Stoklosa T., Legat M. The influence of photodynamic therapy on the immune response // Photodiag. Photodynam. Ther. – 2005. – Vol. 2. – P. 283–98.
66. Oleinick N., Morris R., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why and how // Photochem. Photobiol. Sci. – 2002. – Vol. 1. – P. 1–7.
67. Preise D., Oren R., Glinert I. et al. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity // Cancer. Immunol. Immunother. – 2009. – Vol. 58. – P. 71–84.
68. Pushpan S.K., Venkatraman S., Anand V. et al. Porphyrins in photodynamic therapy- a search for ideal photosensitizer // Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents. – 2002. – Vol. 2. – P. 187–2.
69. Reed M., Miller F., Weiman T. et al. The effect of photodynamic therapy on the microcirculation // J. Surg. Res. – 1988. – Vol. 45. – P. 452–9.
70. Reed M., Schuschke D., Ackermann D. et al. The response of the rat urinary bladder microcirculation to photodynamic therapy // J. Urol. – 1989. – Vol. 142. – P. 865–8.
71. Reiter I., Schwamberger G., Krammer B. Effect of photodynamic pretreatment on the susceptibility of murine tumor cells to macrophage antitumor mechanisms // Photochem. Photobiol. Sci. – 1997. – Vol. 66. – P. 384–8.
72. Riedemann N.C., Ward P.A. Complement in ischemia reperfusion injury // Am. J. Pathol. – 2003. – Vol. 162. – P. 363–7.
73. Sierra-Rivera E., Voorhees G.J., Freedman M.L. γ irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells // Radiat. Res. – 1993. – Vol. 135. – P. 40–5.
74. Sun J., Cecic I., Parkins C., Korbelik M. Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumors // Photochem. Photobiol. Sci. – 2002. – Vol. 1. – P. 690–5.
75. Scheffer S.R. Apoptotic, but not necrotic tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo // Int. J. Cancer. – 2003. – Vol. 103. – P. 205–11.
76. Shaif-Muthana M. Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 6441–7.
77. Savellano M., Hasan T. Targeting cells that overexpress the epidermal growth factor receptor with polyethylene glycolated BPD verteporfin photosensitizer immunoconjugates // Photochem. Photobiol. – 2003. – Vol. 77. – P. 431–9.
78. Starnes C. Coley's toxins in perspective // Nature. – 2004. – Vol. 357. – P. 11–12.
79. Seya T. Role of toll-like receptors and their adaptors in adjuvant immunotherapy for cancer // Anticancer Res. – 2003. – Vol. 23. – P. 4369–76.
80. Saji H. Systemic antitumor effect of intratumoral injection of dendritic cells in combination with local photodynamic therapy // Clin. Cancer. Res. – 2006. – Vol. 12. – P. 2568–74.
81. Todryk S. Heat shock protein 70 induced during tumor killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake // J. Immunol. – 1999. – Vol. 163. – P. 1398–408.
82. Thong P.S., Ong K.W., Goh N.S. et al. Photodynamic-therapy-activated immune response against distant untreated tumors in recurrent angiosarcoma // Lancet. Oncol. – 2007. – Vol. 8. – P. 950–2.
83. Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors // Annu. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 21. – P. 335–76.
84. Uehara M. Enhancement of photodynamic antitumor effect by streptococcal preparation OK-432 in mouse carcinoma // Cancer. Immunol. Immunother. – 2000. – Vol. 49. – P. 401–9.
85. Van Duijnhoven F.H. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review // Immunobiology. – 2003. – Vol. 207. – P. 105–13.
86. Vrouenraets M., Visser G., Stigter M. Targeting of aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies: improved efficacy in photodynamic therapy // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 1970–5.
87. Vrouenraets M., Visser G., Stewart F. et al. Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-mono-clonal antibody conjugates for photoimmunotherapy // Cancer Res. – 1999. – Vol. 59. – P. 1505–13.
88. Yenari M. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat shock protein protection // Ann. NY Acad. Sci. – 2005. – Vol. 1053. – P. 74–83.
89. Zitvogel L. Immune response against dying tumor cells // Adv. Immunol. – 2004. – Vol. 84. – P. 131–79.
90. Zhang H., Ma W., Li Y. Generation of effective vaccines against liver cancer by using photodynamic therapy // Laser. Med. Sci. – 2009. – Vol. 24. – P. 549–52.

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ

УДК 616.006.6-084:577.161.1

*М.Я. Шашкина, П.Н. Шашкин, А.В. Сергеев***РОЛЬ КАРОТИНОИДОВ
В ПРОФИЛАКТИКЕ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация*Шашкина Мария Яковлевна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории по созданию нетоксичных иммуномодуляторов НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(499)612-80-62**e-mail:** abk200645@mail.ru

Статья поступила: 21.05.2009, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

В обзоре приведен краткий анализ экспериментальных исследований отдельных каротиноидов и препаратов на их основе в системах *in vitro* и *in vivo*. Достоверно показано, что каротиноиды обладают антиканцерогенными, антимуtagenными, иммуномодулирующими, антиоксидантными свойствами. Обобщены результаты пилотных клинических апробаций в группах повышенного риска (жители Северного региона, курящие) и в группах больных различного профиля в качестве средств сопровождения с целью снижения токсичности базовой терапии и повышения эффективности лечения. Данные экспериментального и клинического изучения свидетельствуют о перспективности разработки на основе каротиноидов оригинальных препаратов лечебно-профилактического назначения. В РОИЦ им. Н.Н.Блохина РАМН создана серия таких препаратов и организован выпуск некоторых из них. Препараты предназначены для массового оздоровления населения.

Ключевые слова: β -каротин, каскатол, антиоксиданты, иммуномодуляция, профилактика рака.*M.Y. Shashkina, P.N. Shashkin, A.V. Sergeev***CAROTENOIDS
IN HUMAN HEALTH AND PREVENTION OF DISEASES**

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

Abstract

Analysis of experimental research *in vitro* and *in vivo* will be considered by a discussion of various types of activities which carotenoids can possess (anticarcinogenic, antimutagenic immunomodulator et al.). In this review we summarized the data concerning protection and immunostimulation of some diseases by carotenoids, their ability to exert not only chemopreventive but also therapeutic effects in adjuvanted cancer therapy and other diseases. They are effective also in groups of risk. Experimental and clinical studies are ground for development of original cancer preventive drugs on the basis of carotenoids.

Key words: β -carotene, cascatol, antioxidant, immunomodulation, cancer prevention.**Введение**

Интерес к каротиноидам значительно возрос в связи с выявленной возможностью использования их в профилактике злокачественных новообразований. Каротиноиды повышают резистентность организма к воздействию мутагенов и канцерогенов. Проблема борьбы с раком чрезвычайно важна, так как ежегодно в мире умирают от онкологических заболеваний около 6,2 млн. человек, а заболевают 10 млн. Только в России в 2005 г. число больных с впервые установленным диагнозом «рак» возросло до 470 тыс. человек, что на 4,6 % больше по сравнению с 2000 г. [24].

Известно, что 80% онкологической заболеваемости зависит от образа жизни, состояния окружающей среды, психо-эмоциональных факторов, особенностей питания. Как показали эпидемиологические исследования 30–50% различных опухолевых заболеваний происходит из-за несбалансированно-

сти питания [74]. Обогащение рациона каротиноидами или назначение β -каротина по 6–8 мг ежедневно позволяет снизить риск рака легкого в 2–3 раза (особенно у курящих), рака пищевода – в 3–5 раз, рака шейки матки – в 3–5 раз, рака молочной железы – на 30 % по сравнению с лицами, потребляющими меньше каротиноидов [49].

Выявлена обратная корреляция между концентрацией β -каротина в плазме крови и риском развития рака [49]. По данным Института питания, уровень β -каротина в плазме крови у большинства населения нашей страны снижен в 2 раза по сравнению с населением зарубежных стран.

Это является следствием недостаточного поступления каротиноидов с пищей, что, несомненно, приводит к патологическим нарушениям в организме и повышению риска развития рака и других дегенеративных заболеваний (сердечно-сосудистые, катаракта и пр.).

Экспериментальные исследования

Многочисленные экспериментальные исследования за рубежом и в нашей стране в системах *in vitro* и *in vivo* показали, что каротиноиды проявляют медико-биологические свойства лечебно-профилактического характера: антиканцерогенные и антимуtagenные, антиоксидантные и радиопротекторные, иммуномодулирующие и антисклеротические, противовоспалительные и антитоксические.

Антиканцерогенная активность синтетического β -каротина обоснована многочисленными исследованиями на моделях химически индуцированного и спонтанного канцерогенеза различных локализаций (молочная железа, пищевод, печень, кожа и пр.). Липосомальный β -каротин снижал частоту возникновения опухолей молочной железы крыс, индуцированных канцерогеном – МНМ (метилнитрозомочевина) до 47–50 % (контроль 81 %) и увеличивал средний латентный период появления опухолей на 50–85 % по сравнению с контролем. Средняя продолжительность жизни животных возрастала на 24–42 % [1]. Водорастворимый каротин в подобной модели не оказывал влияния на канцерогенез МЖ и пищевода, но тормозил (на 47 %) развитие карцином влагалища и шейки матки мышей [1].

На другой модели с использованием белых крыс снижалось в 2 раза количество опухолей МЖ, индуцированных ДМБА (7,12-диметилбензантрацен), по сравнению с плацебо группой. Увеличивался латентный период развития фибросаркомы кожи крыс на 36,8 % при подкожном введении ДМБА в группах с β -каротином в сравнении с контролем. Под влиянием β -каротина уменьшалась множественность опухолей кожи мышей, индуцированных ДМБА, и достоверно увеличивался латентный период появления первой опухоли [3]. При подкожном введении диметилгидразина и добавке в корм β -каротина возрастала средняя выживаемость крыс в 3–4 раза (на 30-е сутки) и в 2,5 раза (на 40-е), уменьшалось количество опухолей.

β -каротин способствовал снижению в 2–3 раза числа опухолей желудочно-кишечного тракта (пищевод, глотка, преджелудок) крыс, индуцированных МБНА (метилбензилнитрозамин), и в 1,5–2 раза – индекса множественности опухолей в сравнении с контролем. На всех исследованных моделях синтетический β -каротин дозозависимо задерживал развитие новообразований и увеличивал продолжительность жизни животных [3; 13]. Антиканцерогенными свойствами обладали также природные каротиноиды, выделенные из плодов шиповника. Они задерживали спонтанный канцерогенез печени мышей линии СВА на 6 мес. и увеличивали продолжительность жизни животных в 3,6 раза (более 2 лет в опытных группах выживало 36 % животных, в контроле – 10 %) [13].

Каротиноиды шиповника ингибировали канцерогенез желудка обезьян, индуцированный ЭННГ (этилнитронитрозогуанидин). Латентный период появления опухолей увеличивался в 1,5 раза (опыт – 15 мес, контроль – 9 мес). Повышалась выживаемость животных до 92,3 % (контроль – 72,7 %) [15]. Антиканцерогенным действием обладали и другие каротиноиды (фукоксантин, ликопин и пр.) [49]. Криптоксантин и ликопин защищали дозозависимо 25–50 % крыс линии F-344 от рака толстой кишки, индуцированного МНМ [44; 60]. Кантаксантин снижал на 65% случаи рака МЖ крыс, индуцированного ДМБА, при профилактическом применении [44].

Противоопухолевая или цитотоксическая активность каротиноидов исследовалась в системе *in vitro* в культуре на различных штаммах раковых кле-

ток. По данным китайских ученых [53] β -каротин в дозе 6,25 мг/мл значительно ингибировал колонию-образование клеток рака легкого человека линии 801, при повышении концентрации в 2 раза наблюдалось полное ингибирование. Показано, что рост мелкоклеточного рака легких каротиноиды ингибировали за счет замедления пролиферации и увеличения числа клеток в фазе G₁/G₀ [40]. β -каротин изменял морфологию опухолевых клеток NCI-H69 мелкоклеточного рака легких: увеличивалось содержание вакуолей, снижалось ядерное содержимое (ЯС) клеток и отношение ЯС к цитоплазме, что свидетельствовало о снижении их злокачественности. β -каротин не только индуцировал морфологические изменения в опухолевых клетках, но и уменьшал их пролиферацию [67]. При включении β -каротина в корм имбредных мышей с трансплантированным штаммом мышины аденокарциномы легких (в системе *in vivo*) наблюдалось снижение спонтанного метастазирования в легкие на 42–68 % [53]. На модели рака предстательной железы, трансплантированной крысам-самцам линии АС1 наблюдалось дозозависимое торможение роста опухолей на 17–62 % под влиянием ликопина, полученного из мицелиальных грибов [4]. О противоопухолевом и антиканцерогенном действии ликопина в литературе сообщалось неоднократно [47; 49]. Он снижал риск рака простаты, ингибируя пролиферацию эпителиоцитов простаты и усиливая защиту ДНК от окислительного стресса, что предотвращало доброкачественную гиперплазию простаты [75]. Ликопин в комбинации с α -токоферолом в физиологической концентрации сильно (до 90 %) ингибировали пролиферацию клеток карциномы простаты [65]. Сообщается, что каротиноиды (ликопин, астаксантин) ингибируют дозозависимо до 98 % энзиматическую активность 5- α -редуктазы и уменьшают симптомы, начинающейся гиперплазии простаты [29].

О механизмах антиканцерогенного и противоопухолевого действия каротиноидов однозначных данных нет. Сообщается о снижении способности раковых клеток синтезировать ДНК и РНК через 24 ч после применения β -каротина (25 мг/мл), при этом способность синтеза ДНК лимфоцитов не изменяется. Экспериментально доказано, что β -каротин ингибирует экспрессию *RAS p21* онкогена в раковых клетках [53]. По данным японских исследователей эффективность каротиноидов (α -, β -каротин, ликопин) при гепатоканцерогенезе зависит от величины применяемых доз и их влияния на межклеточные взаимодействия (МКВ). Высокие дозы ингибировали МКВ, средние – увеличивали, низкие – не влияли на них [52].

Зеаксантин (фоторецепторный протектор) достоверно индуцировал апоптоз нейробластомных клеток СНР 100 (резистентных к апоптозу) и в то же время не ингибировал активность монооксигеназы, участвующей в защите здоровых клеток [58]. Почему каротиноиды, с одной стороны, защищают нормальные клетки от малигнизации, а с другой – непосредственно действуют на раковые клетки, вызывая регрессию их, пока неизвестно. Все гипотезы о механизмах основываются на биологических свойствах каротиноидов (антиоксидантные, иммуномодулирующие, антимуtagenные, провитаминные) и влиянии их на межклеточные взаимодействия или межклеточные связи [15]. Однако первичный эффект неясен. Представляет интерес также гипотеза о способности каротиноидов модифицировать физические свойства биомембран. Жесткая линейная структура молекулы каротиноидов исключает вращение вокруг С–С связей.

Каротиноиды встраиваются в биомембраны клеток и подобно арматурным прутьям пронизывают гидрофобную зону липидного бислоя, изменяя «текучесть» мембраны. А от текучести мембраны зависит активность мембранных белков, ионных каналов и насосов, переносчиков и рецепторов, скорость диффузии воды и кислорода [7]. Известно, что высокий уровень «текучести» биомембран важен для активно растущих, пролиферирующих клеток, в т.ч. – для метастазирования различных опухолей. Экспериментально обнаружено, что уровень «текучести» мембран может регулироваться концентрацией каротиноидов в них. При встраивании в модельную липидную мембрану небольшого количества каротиноидов (1 молекула на 1000 молекул липидов, т.е. 0,1 моль %) возрастал уровень упорядоченности ее структуры. С повышением концентрации каротиноидов до 1–10 моль % «текучесть» мембраны снижалась, увеличивалась ее вязкость. При дальнейшем росте концентрации мембрана становилась хрупкой (влияние холестерина было в 3 раза слабее). Это дает основание считать, что встраивание каротиноидов в мембраны опухолевых клеток должно ингибировать их пролиферацию. Показано, что при концентрации каротиноидов в культуральной среде 10^{-5} М опухолевые клетки (10 Т 1/2) накапливали в мембране до 1,3 моль % каротиноидов (в пересчете на липиды), что способствовало снижению «текучести» мембраны и замедлению пролиферации клеток. Модифицирующее влияние каротиноидов на «текучесть» мембраны возможно является ключевым в механизме противоопухолевого действия [7]. Сообщается о влиянии β -каротина на пролиферацию и «up»-регуляцию экспрессии С-тус в клетках лейкоза человека (HL-60). Авторы предполагают, что ингибирование роста клеток HL-60 β -каротином, по-видимому, обусловлено индукцией апоптоза и «up»-регуляцией экспрессии С-тус [78]. β -каротин дозозависимо ингибировал пролиферацию гепатических раковых клеток линии SMMC-7721, как предполагают авторы, за счет вмешательства в метаболизм ДНК и индуцирования клеточного апоптоза [57].

Антимутагенная активность каротиноидов оценивалась в двух системах: по количеству хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, индуцированных цитостатиками, и по количеству ревертантов гистидина (HIS^+), индуцированных циклофосфаном в тесте Эймса. β -каротин (10 мг/кг) снижал в 1,5–3 раза количество хромосомных aberrаций, индуцированных цитостатиками, и в 2 раза количество колоний ревертантов HIS^+ в тесте Эймса. По эффективности отечественный β -каротин не уступал зарубежному (Hoffmann-La-Roche). Антимутагенную активность проявляли ликопин и природные каротиноиды из плодов шиповника. Под их влиянием количество хромосомных aberrаций, индуцированных γ -облучением в дозе 4,7 Гр, снижалось до 53–42% (в контроле 86%) [22; 51]. В системе *in vitro* β -каротин и ликопин в физиологических концентрациях ингибировали до 90 % повреждений ДНК, индуцированных катехолэстрогенами (4-гидроксиэстрадиол и 2-гидроксиэстрадиол), которые являются известными канцерогенами [59].

Антиоксидантные свойства каротиноидов изучены методом флуоресценции и хемилюминисценции. Каротиноиды защищают липиды низкой плотности (LDL) клеточных мембран от окислительного стресса, индуцированного синглетным кислородом, квантами света, радиоллизом или окислением в присутствии Cu^+ . При этом они могут

частично компенсировать дефицит витамина Е в LDL [63]. Механизм антиоксидантного действия каротиноидов базируется на улавливании свободных радикалов, а витамина Е – на окислительно-восстановительных реакциях, что и обуславливает их синергизм [55]. Являясь эффективными «ловушками» свободных радикалов, каротиноиды могут подвергаться автоокислению с образованием эндоперекисей, резонансно-стабильных радикалов, карбонильных соединений [38]. Продукты автоокисления обладают цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток [48]. Эффективность каротиноидов как антиоксидантов зависит от их взаимодействия с другими антиоксидантами, особенно с витаминами Е и С. Но при высоком парциальном давлении кислорода, оксидантном стрессе, каротиноиды в высокой концентрации имеют тенденцию к потере антиоксидантной активности и даже могут проявлять прооксидантные свойства [77]. Однако не все каротиноиды становятся прооксидантами. Так, астаксантин и другие кетокаротиноиды являются мощными антиоксидантами и не проявляют прооксидантного действия даже при высоком парциальном давлении кислорода. Высказывается предположение, что за счет антиоксидантных и прооксидантных свойств каротиноиды вероятно могут участвовать в регуляции роста клеток [64] и выступать в качестве антиоксидантных модуляторов клеточного метаболизма [12].

Иммунотенезирующая активность β -каротина изучена на моделях первичного иммунного ответа в системах с приобретенным и врожденным иммунодефицитом. Под влиянием β -каротина в первичном иммунном ответе на Т-зависимый антиген эритроцитов барана увеличивалось в 1,5–6 раз число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей в зависимости от дозы и режимов применения. Каротиноиды из плодов шиповника стимулировали количество АОК до 139–149 % [51]. В системе с винбластином, который ингибировал антителообразование и снижал АОК в 2,6 раза, β -каротин полностью снимал иммунодепрессию. В системе с врожденным иммунодефицитом у мышей СВА β -каротин нормализовал количество АОК и увеличивал продукцию интерлейкина (ИЛ)-2 на 30%. На модели с иммунодепрессией, вызванной гидрокортизоном, β -каротин нормализовал продукцию ИЛ-2 [5; 22]. На модели крыс с адьювантным артритом β -каротин увеличивал продукцию ИЛ-1 в перитонеальных макрофагах и снижал опухолевый процесс [30].

β -каротин (70 мг/кг массы тела мышей) усиливал пролиферацию реагирующих клеток в аллогенной смешанной культуре лимфоцитов в 1,7 раза, стимулировал цитотоксичность макрофагов, Т-киллерных клеток, индуцированных аллоантигеном. В ответ на объект фагоцитоза он максимально увеличивал продукцию активных форм кислорода макрофагами. В то же время способствовал дозозависимому снижению уровня, супрессорной активности Т-лимфоцитов и стимуляции противоопухолевого иммунитета [20]. Изучена возможность коррекции β -каротином возрастного иммунодефицита на 4 группах мышей линии СВА: молодые, половозрелые, старые – 1,5 года, сверхстарые – возраст 2–2,5 года. У старых и сверхстарых мышей наблюдалось изменение иммунологических показателей со снижением интерлейкинов и АОК в 1,5–2 раза по сравнению с молодыми. При добавлении в корм β -каротина (2 мг/кг) 2 раза в неделю в течение 2–6 месяцев наблюдалась нормализация всех показателей гуморального и клеточного иммунитета у старых и сверхстарых животных.

Индекс стимуляции интерлейкина повышался с 1,7–1,2 до 3,0. Количество АОК в селезенке сверхстарых мышей возрастало в 4 раза (с 25,6 тыс. до 106,6 тыс.), у старых, соответственно – с 94,2 тыс. до 117 тыс. и приближалось к показателям молодых и половозрелых мышей (131,5 тыс.; 120,7 тыс. соответственно). Применение β -каротина не вызывало существенных изменений показателей у молодых и половозрелых животных. β -каротин способствовал увеличению средней продолжительности жизни старых и сверхстарых животных на 50 % по сравнению с контролем (С. Алпатов). В литературе появилось сообщение о влиянии каротиноидов и других антиоксидантов на повышение количества глутатиона и восстановление антиоксидантного статуса в митохондриях ускоренно стареющих мышей [69]. Антиоксидантная и иммуномодулирующая активность β -каротина при возрастном иммунодефиците позволяет рекомендовать его с профилактической целью для повышения качества и продолжительности жизни лицам преклонного возраста.

Радиопротекторная активность β -каротина и ликопина исследовалась на мышцах линии F1. Применение каротиноидов в профилактическом режиме (до облучения) в дозе 7,5 Гр (LD_{100}) увеличивало продолжительность жизни животных на 20–50 %. Каротиноиды защищали животных от ранней пострadiационной гибели. Через 7 дней после облучения потеря массы тела животных была в 2 раза меньше, чем в контроле. Ежедневное применение β -каротина за 10 дней до облучения в дозе 9 Гр снижало раннюю гибель в 2 раза и увеличивало продолжительность жизни животных на 35 %. Использование каротиноидов в режиме до и после облучения дозой 6 Гр (LD_{60}) достоверно увеличивало выживаемость животных на 90 %. Однако повышение дозы облучения до 9 Гр сокращало продолжительность жизни по сравнению с контролем. Очевидно, каротиноиды при облучении высокими дозами вовлекаются в каскад индуцированных свободно-радикальных процессов. Неэффективно было и применение каротиноидов в лечебном режиме [27]. Радиозащитная эффективность ликопина была в 1,5–2 раза выше, чем β -каротина [11].

Антиоксидантная активность препаратов β -каротина изучена на модели химической свинцовой интоксикации крыс. По данным С.М. Галачиева препараты β -каротина увеличивали выживаемость животных, снижали симптомы свинцового токсикоза и улучшали показатели крови.

Гипохолестеринемический эффект ликопина и β -каротина исследовали в системе *in vitro* на макрофагах. Ликопин и β -каротин супрессировали синтез холестерина в клетках макрофагов мышей, ингибировали включение [3H] ацетата во вновь синтезированный холестерин, предотвращали окисление LDL и их захват макрофагами. Гипохолестеринемический эффект каротиноидов, по-видимому, обусловлен конкурентным дозозависимым ингибированием синтеза холестерина в клетках из ацетилкоэнзима А. При этом ликопин был эффективнее β -каротина. В концентрации 10 μM ликопин ингибировал синтез холестерина на 73%, а β -каротин – на 63%. Поэтому обогащение клеток каротиноидами может снизить уровень холестерина и окисленного LDL в плазме, что подтверждено клинически [39]. Эпидемиологические исследования свидетельствуют об обратной корреляции между концентрацией каротиноидов в плазме крови пациентов и уровнем холестерина [39]. Гиполипидемическое действие ликопина показано на модели экспериментального атеросклероза кроликов [10].

Гастропротекторная активность ликопина выявлена на моделях острого гастрита крыс, индуцированного гидрокортизоном, серотонином, этанолом [16].

Каротиноиды в профилактике заболеваний по данным эпидемиологических и клинических наблюдений «Carotenoids in Human Health» – под таким девизом состоялась международная конференция в Сан-Диего (1993), организованная АН Нью-Йорка (США). На конференции обсуждались результаты фундаментальных и прикладных исследований каротиноидов и их роли в здоровье человека, проведенные в университетах США, Германии, Швейцарии, Италии, Японии, Австралии [33].

Каротиноиды в профилактике и улучшении защитных функций организма. Анализ более 100 эпидемиологических исследований показал, что потребление овощей и фруктов, богатых каротиноидами, способствовало снижению риска развития рака легких, желудка, пищевода, ротовой полости и др. При снижении уровня каротиноидов в пище увеличивался риск развития онкологических заболеваний. В штате Мериленд (США) исследовали влияние уровня каротиноидов в плазме крови (590 человек) на риск развития РМЖ. Анализ данных показал, что каротиноиды могут предотвращать развитие РМЖ [71]. С уровнем каротиноидов в плазме крови отрицательно коррелировало окислительное повреждение лимфоцитов человека. Потребление пищи, богатой каротиноидами, значительно снижало повреждение ДНК [35]. Каротиноиды защищали лимфоциты крови, взятой у пациентов, принимающих их, от генотоксического действия (хромосомных повреждений) антибиотика блеомицина в эксперименте *in vitro* [31]. Потребление каротиноидов снижало размеры и рецидивы предопуховых повреждений ротовой полости у пациентов с предшествующими, но не существующими заболеваниями [41]. Дефицит каротиноидов в пище влияет на состояние кожи. В. J. Burri et al. [32] обнаружили кожные нарушения у женщин в менопаузе с низким уровнем β -каротина в пище. У 7 из 9 взрослых женщин развились кожные поражения при использовании низко-каротиноидной диеты в течение 68 дней. У них наблюдалась сухость кожи, зуд, затуманенность зрения, уменьшалась адаптация к темноте, повышалась светочувствительность, проявлялось нарушение менструального цикла и стрессовое состояние. Применение β -каротина снижало эти нарушения, в отличие от группы без β -каротина. Очевидно, улавливая синглетный кислород, β -каротин и другие каротиноиды защищают кожные покровы от воспаления, индуцированного УФ облучением, и некоторых форм рака, что подтверждено в экспериментах на животных. Однако интервенционные клинические наблюдения с включением лекарственных препаратов β -каротина не дали однозначных результатов по профилактике рака кожи. Причины не ясны, возможно многое зависит от выбора доз и режимов применения каротиноидов, ингредиентного состава препаратов. W. S. White et al. сообщали о значительном снижении содержания каротиноидов в циркулирующей крови при УФ-облучении [76]. Применение β -каротина одного или в комбинации с α -токоферолом в течение 12 недель уменьшало на 8-й неделе, образование эритемы – покраснения кожи, как начальной реакции УФ облучения [73].

β -каротин был применен по 20 мг ежедневно в течение 4 мес. для лечения предменструальных масталгий в комбинации с высокими дозами ретинола (150–300 тыс. ЕД в течение 7 дней перед менструацией).

Эта оригинальная схема как способ снижения боли показал, что терапевтический эффект наблюдался за счет синергизма препаратов: снижения токсичности ретинола и противовоспалительного действия β -каротина, обусловленного его антиоксидантными свойствами [70]. Биомаркеры процесса воспаления ассоциируются со снижением уровня ретинола и каротиноидов в крови [72]. Высказывается мнение, что каротиноиды являются лучшими сигнальными маркерами, измерение которых в пище, плазме крови и тканях имеет важное значение в определении оптимальной диеты для сохранения здоровья человека [45]. Изучена возможность использования β -каротина для иммунокоррекции в группах риска экологически неблагоприятного Северного региона России. Комплексная оценка иммунного статуса 177 практически здоровых лиц показала низкое содержание в сыворотке крови В-лимфоцитов и повышенное – иммуноглобулинов. После применения драже β -каротина (10 мг в сутки 3 декадными циклами) уровень В-лимфоцитов возрос до верхних физиологических значений. Нормализовалась продукция иммуноглобулинов и уровень β -каротина в крови. В группе часто болеющих детей (104 человека) наблюдалось значительное снижение фагоцитарной активности клеток периферической крови по сравнению со здоровыми (28,5 против 42,9 %). После месячного курса применения драже β -каротина по 2,5 мг в сутки, фагоцитарная активность клеток возросла до 47,8 %, повышалось содержание IgG в сыворотке крови, IgA – уменьшалось. Улучшение иммунологических показателей сопровождалось снижением заболеваемости детей этой группы [6].

Эпидемиологические исследования свидетельствуют об обратной корреляции между концентрацией каротиноидов в пище и риском атеросклероза [42]. Каротиноиды защищают от атеросклероза, снижали случаи прогрессии заболеваний сердечно-сосудистой системы [9; 49]. Кардиопротекторный механизм действия каротиноидов связан с гипохолестеринемическими и антиоксидантными свойствами их. Каротиноиды способствуют снижению уровня LDL и повышению уровня липидов высокой плотности, предотвращают изменение функций макрофагов и трансформацию их в пенные клетки, которые являются интегральным компонентом атеросклеротических бляшек [42].

Одной из распространенных причин риска развития дегенеративных заболеваний является табакокурение. У курильщиков значительно нарушена антиоксидантная защитная система. Уровень β -каротина в плазме крови снижен в 1,5–2 раза. Проведено рандомизированное исследование каскатола (препарат на основе β -каротина с витаминами С и Е) в группах курильщиков-добровольцев (450 человек) со сроком курения около 20 лет. Через 1,5–2 мес. применения каскатола по 2 драже 3 раза в день концентрация β -каротина в крови возросла в 3–4 раза по сравнению с исходной, нормализовалась концентрация витаминов Е и А. В плацебо группе значительных изменений не было. Через 1 год наблюдения у 60 % участников улучшилось общее состояние здоровья (в группе плацебо – только у 15 %). При этом 15 % злостных курильщиков прекратили курение, а 23 % – сократили число сигарет в день (в группе плацебо 6 и 11 % соответственно) [54].

В других исследованиях применение β -каротина (50 мг ежедневно в течение 1 года) сопровождалось повышением уровня β -каротина в плазме в 9–10 раз, через 5–7 лет выявлены случаи повыше-

ния рака легких у курильщиков [43; 49]. В связи с этим требуется осторожность при профилактическом применении каротиноидов (как и других антиоксидантов) у курильщиков, так как курение усиливает оксидантный стресс. Во избежание проявления прооксидантных свойств каротиноидов нецелесообразно применять их одновременно с курением и в больших дозах, что имело место в случае когортных исследований [33; 43].

В Японии выявлен антистрессовый эффект β -каротина [46] в группе спортсменов-велосипедистов. Известно, что истощающие упражнения на велопедале индуцируют стрессорное состояние за счет увеличения уровня стрессорных гормонов в плазме крови, таких как кортикотропные гормоны, адреналин, норадреналин, АКТГ.

β -каротин (30 мг за 2 ч до упражнений) супрессовал секрецию этих гормонов и полностью ингибировал стрессорные реакции. Механизм действия, как полагают, связан с дозозависимой супрессией секреции кортикотропного гормона, который контролирует секрецию АКТГ в гипофизе. В дозе 6 мг β -каротин ингибировал секрецию АКТГ на 20 %, 30 мг – 85 %, 60 мг – 100 % по сравнению с контролем без β -каротина [46].

Апробация каротиноидов в качестве средств сопровождения при лечении хронических заболеваний

Проведена апробация каротиноидов в качестве средств сопровождения при лечении онкологических, предопухольных и сопутствующих заболеваний с целью повышения эффективности лечения за счет их иммунокорректирующих, антиоксидантных, антитоксических и др. свойств.

Онкологические больные

Современная стратегия лечения рака основана на оптимизации традиционной цитотоксической терапии, но все большее значение приобретает способ включения в схемы комплексного лечения больных нетоксичных средств иммунокоррекции и модификаторов противоопухольной терапии, в том числе каротиноидов [34; 56].

В отделении проктологии НИИ КО РОНЦ находились больные раком толстой и прямой кишки (65 человек). У всех пациентов наблюдалось снижение показателей антиоксидантной защитной системы (АОЗ) и клеточного иммунитета по сравнению со здоровыми лицами (МДА 9,7 мкМ/л против 6,1; СОД 60,1 мкг/мл эрит. против 67,9). У больных цитотоксическая активность натуральных киллеров была снижена в 1,5–2 раза по сравнению со здоровыми. Предоперационное облучение ухудшало многие из этих показателей.

Применение β -каротина по 30 мг ежедневно в течение 2 недель в предоперационный период способствовало улучшению и нормализации биохимических и иммунологических показателей крови, в том числе и содержания β -каротина. У больных раком толстой кишки, получавших микрогранулы β -каротина, снижалась частота послеоперационных осложнений (5,5 против 28,5 %) [20]. Использование β -каротина (250 мг ежедневно) в предоперационном периоде у больных раком легкого III стадии (11 человек, в контроле – 14) статистически достоверно улучшало иммунологические показатели без послеоперационных осложнений (в контроле у 3 больных – 21 %) [8]. В Италии проведены пилотные испытания по использованию β -каротина (80 мг/день) в адьювантной радиотерапии пациентов неоперабельным раком легкого.

Применение β -каротина способствовало повышению общей выживаемости в 1,5–3 раза по сравнению с ожидаемой [70]. Применение β -каротина (80–40 мг/день в процессе ЛТ у пациентов с опухолями головы и шеи снижало до 70 % генотоксичность радиотерапии (по данным теста: количество микроядер в эпителиальных клетках слизистой) [37].

Назначение драже β -каротина (10 мг ежедневно в межкурсовый период после химио- и радиотерапии) детям с гемобластомами по 5 мг 3–5 раз/день и со злокачественными лимфомами способствовало улучшению клинических, иммунологических и биохимических показателей крови, повышению и нормализации уровня β -каротина и суммы каротиноидов в плазме крови, снижению осложнений и интоксикаций полихимиотерапии и радиотерапии [17]. Перспективным было применение препарата β -каротина («Каскатол») при комбинированном лечении больных РМЖ (55 больных) I–II стадии и больных раком яичников (30 женщин) в период предоперационной подготовки. Применение препарата у всех больных вызвало заметный детоксикационный эффект, который выражался в снижении соответствующих завышенных показателей крови (МСМ и МДА), повышении активности СОД, нормализации активности каталазы и антиоксидантного статуса. Уровень β -каротина в плазме крови возрастал в 1,2–1,5 раза. Нормализовались не только биохимические, но и иммунологические показатели, вследствие чего уменьшалось число послеоперационных осложнений [2; 50]. По данным Н.В. Морозкиной [19] комплексы витаминов А; Е; С с β -каротином превосходят по корректирующей активности соответствующие витаминные комплексы без β -каротина при лечении больных раком желудка в пред- и послеоперационные периоды. Они быстрее нормализуют АОС и эффективнее восстанавливают липопротеиновый спектр плазмы крови. При этом достоверно снижается до нормы количество атерогенных LDL и повышается количество липопротеинов высокой плотности, что уменьшает риск развития атеросклероза у больных и является благоприятным метаболическим фоном для предотвращения послеоперационных осложнений и состояния «оксидантного» стресса. Применение β -каротина у операбельных больных раком желудка предотвращало развитие местных рецидивов и отдаленных метастазов [28]. Значительная коррекция процессов АОС и перекисного окисления липидов (ПОЛ) была достигнута у больных раком печени и панкреатодуоденальной зоны при использовании в предоперационной подготовке больных комплекса β -каротина с витамином Е перорально и аскорбиновой кислоты внутривенно [25]. У больных на 22,5–28 % снижалась частота послеоперационных осложнений, повышалась функциональная активность клеточного звена иммунитета – АОС самой печени. Успешным было применение антиоксидантных комплексов с β -каротином при комбинированном лечении больных раком яичников [14]. Повышение адаптационных возможностей организма является одним из факторов, способствующих уменьшению послеоперационных осложнений. У больных раком яичников осложнения снизились в 1,5 раза и составили 23 % (в контроле 35 %). Повысилось качество жизни, многие женщины продолжали трудовую деятельность во время лечения (5 из 10, в контроле – 3 из 31). Благодаря стабилизации уровня лейкоцитов и снижению степени лейкопении после радиотерапии больных раком яичников удалось сократить интервалы между курсами послеоперационной химиотерапии и провести ее в интенсивном режиме и в запланированное время. У женщин с предраком и

раком МЖ под влиянием β -каротина улучшались иммунологические показатели [21].

Кардиологические больные

Назначение драже β -каротина (10 мг) кардиологическим больным в постинфарктный период в течение 30 дней на фоне традиционного лечения ускорило нормализацию реологических показателей крови, концентрацию β -каротина в плазме крови, повышало работоспособность пациентов в 2 раза, способствовало сокращению реабилитационного периода. Уменьшилась частота безболевого ишемии и аритмии по сравнению с пациентами группы контроля [26]. Применение ликопина (60 мг/день в течение 3 мес.) значительно уменьшило (на 14 %) концентрацию холестерина в плазме крови волонтеров. Уровень окисленного LDL снижался через 1 неделю в сравнении с контролем. Эпидемиологические исследования показали обратную связь между уровнем ликопина в плазме, тканях и смертностью от ССЗ, цереброваскулярных заболеваний и инфарктов [68].

Гастроэнтерологические пациенты

Больные гастритом. В группе подростков с хроническим хеликобактерным гастритом 30-дневное применение драже β -каротина (по 10 мг ежедневно) способствовало улучшению процессов репарации, снижению степени хронического воспаления и дистрофических изменений поверхностного эпителия. Гистологические исследования через 1 год наблюдений показали значительно меньшую выраженность гастрита в опытной группе по сравнению с контролем. Обострение отмечено в 50 % случаев (в контроле 75 %), эрозии – в 1 и 5 случаях соответственно [18].

Больные циррозом печени, язвой желудка. Запатентована композиция, содержащая природные каротиноиды (β -, α -каротины, ликопин) и витамин Е, которая защищала от развития рака печени у больных циррозом печени (45 человек). Через 5 лет наблюдений рак печени развивался у 12,3 % больных, принимающих каротиноиды, в контрольной группе (45 человек) – у 34,6 %, т.е. в 3 раза меньше, чем в контроле. Природные каротиноиды в 3 раза эффективнее защищали больных циррозом от малигнизации [62]. У больных язвой желудка и 12-перстной кишки под влиянием масляного раствора β -каротина нормализовался АОС и уровень β -каротина в плазме крови [23].

Больные с патологией молочной железы и простаты. На базе Североосетинского онкодиспансера изучена эффективность препарата β -каротина («Каскатол») у больных фиброаденоматозом МЖ (265 человек), принимающих его по 3 драже /день в течение 20 дней в комплексе с селеном и традиционной терапией. У больных уменьшались проявления масталгии и синдрома предменструального напряжения, наблюдалась регрессия пальпаторных и эхографических признаков заболевания, нормализовались показатели гормональной и иммунной системы. Никаких побочных токсических проявлений не обнаружено. Ни у одной пациентки не наблюдалось малигнизации процесса [3]. В группе больных мастопатией (457 человек, г. Москва) «Каскатол» назначали по 1–2 драже 2–3 раза в день на фоне гомеопатического лечения в течение 4–5 мес. Наблюдение проводилось в течение 1,5–2 лет. Полного разрешения инфильтрации удалось достигнуть у 32 (7 %) женщин. У остальных наступила длительная ремиссия со значительным уменьшением самих участков поражения и их числа (по данным УЗИ и рентгенологического анализа).

У пациентов улучшилось самочувствие, нормализовался сон, снизилась интенсивность климатических расстройств [2]. Комплексные препараты β -каротина («Каскатол» и «Каскорутол») применены с гомеопатическими препаратами при лечении аденомы простаты (417 мужчин) в течение 4–5 мес.

Изменения уродинамических показателей свидетельствуют о положительном эффекте у 286 человек (68,8 %), у 96 (23 %) больных эффект лечения удовлетворительный.

Прием препаратов β -каротина в течение 4 недель в предоперационном и послеоперационном периодах (4–5 драже в день) позволил уменьшить объем оперативного вмешательства и провести операции в плановом порядке (Горайнова Л.К.).

Одновременно наблюдалось снижение болевого синдрома и метеочувствительности, нормализация сна, улучшение состояния здоровья пациентов с сопутствующей патологией (ИБС, цереброваскулярные нарушения, метеозависимость) [2].

Патология полости рта. У больных рецидивирующим афтозным стоматитом курсовое применение драже β -каротина (по 10 мг в течение трех 10-дневных циклов с интервалом 7 дней) способствовало уменьшению рецидивов заболевания, периода обострения и его тяжести. В процессе лечения удлинялись сроки ремиссии.

Нормализовались иммунологические показатели крови [6]. Обогащение пищи β -каротином (30 мг/день в течение 2 нед.) снижало размеры и рецидивы предраковых нарушений ротовой полости. R.H. Prabha et al. [66] наблюдали 16 больных лейкоплакией, из них 13 (81 %) показали значительное увеличение NK после применения β -каротина (30 мг/день) в течение 2 мес.

В последующем возрастала цитоксичность NK против таргетных клеток K562. У 71 % пациентов из 13 повышался уровень γ -ФНО в сравнении с пациентами, не отвечающими на применение препарата. Авторы предполагают, что β -каротин потенциально может применяться в лечении предопухольных заболеваний ротовой полости [66]. β -каротин разрешен в США как совершенно безопасное средство и применяется широко в высоких дозах (до 180 мг/день) для лечения фоточувствительности у взрослых с эритропоэтической протопорфирией [49].

Вирусные заболевания. Основываясь на том, что вирус ВИЧ вызывает деструкцию, главным образом Т-хелперных лимфоцитов (CD4), а β -каротин способен стимулировать продукцию Т-хелперных клеток, в 1985 г. проведена серия пилотных испытаний.

В течение 3 недель 10 здоровых добровольцев получали β -каротин (180 мг/день), что привело к повышению CD4 и соотношения CD4/CD8 (CD8 – супрессорные клетки). Группа ВИЧ-инфицированных пациентов (3 человека) принимала в течение недели β -каротин в этой же дозе. Наблюдалось повышение CD4 на 89 %.

Литература

1. Александров В.А., Беспалов В.Г., Петров А.С. и др. Ингибирующая активность водорастворимого и липосомального бета-каротина на различных моделях канцерогенеза // Вопросы онкологии. – 1998. – Т. 44, № 1. – С. 79–85.
2. Барышников А.Ю., Сергеев А.В., Шашкина М.Я. и др. Каскатол и каскорутол в лечебно-профилактической практике. – М., 2007. – 86 с.
3. Болева Л.З. Экспериментально-клиническое обоснование применения микронутриентов и нестероидных противовоспалительных препаратов в профилактике злокачественных новообразований. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – НИИ БИ, Старая Купавна, 2004. – 42 с.

Двойное слепое исследование (в контроле плацебо – лецитин) учеными Орегонского университета включало 21 пациента, инфицированных ВИЧ серо+, которые получали β -каротин (180 мг/день) в течение 4 недель на фоне антиретровирусной терапии.

Отмечалась хорошая переносимость препарата. Использование β -каротина способствовало значимому увеличению всех клеток белой крови ($p=0,01$), достоверному повышению % CD4 клеток ($p=0,02$) и % отношения CD4/CD8 ($p=0,01$) в сравнении с плацебо.

В группе с β -каротином увеличивалось абсолютное число CD4 клеток, отношение CD4/CD8, общих и В-лимфоцитов, а в группе плацебо – данные показатели снижались (хотя и не достигли статистически значимых различий) [33; 36].

В этих исследованиях β -каротин проявил иммуномодулирующую активность и может быть перспективным для создания новых препаратов на его основе и включения их в комплексную терапию ВИЧ-инфицированных пациентов [36].

Больные вирусным гепатитом. По данным японских исследователей группа пациентов с хроническим вирусным гепатитом С получали ликопин (10 мг/день) и α -токоферол перорально. Через 1 год после начала лечения наблюдалось значительное снижение случаев гепатоклеточной карциномы [61].

Заключение

На основе краткого анализа физико-химических и медико-биологических характеристик, эпидемиологических и пилотных клинических испытаний различных каротиноидов показано, что они участвуют в регуляции жизненно важных процессов всех живых организмов, включая человека, растения, бактерии и пр. Каротиноиды играют важнейшую роль в жизнедеятельности здорового человека, защите организма от патологических факторов окружающей среды, возрастных изменений и способствуют улучшению здоровья больных. Включение каротиноидов в схемы лечения различных заболеваний (в т.ч. онкологических, сердечно-сосудистых, инфекционных) в качестве нетоксичных «средств сопровождения» повышает эффективность лечения, ускоряет нормализацию физиологических функций, улучшает сопротивляемость организма. Каротиноиды являются весьма перспективными компонентами для создания на их основе эффективных лечебно-профилактических средств. В результате многочисленных исследований каротиноидов в РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН разработана серия оригинальных композиций на основе β -каротина с включением фито-витаминных субстанций [22]. Препараты имеют лечебно-профилактическое назначение и могут применяться в качестве нетоксичных адаптогенов, иммуномодуляторов и модификаторов. Получено разрешение на их производство и применение. Организован и освоен промышленный выпуск комплексных препаратов.

4. Буренин И.С., Полянская Н.И., Кузьмина З.В. Изучение противоопухолевой активности соединений, полученных из мицелиальных грибов и обладающих выраженными антиоксидантными свойствами // РБЖ – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 48.
5. Буюклинская О.В. Иммунотропная активность синтетического бета-каротина. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1992. – 26 с.
6. Буюклинская О.В. Влияние каротинсодержащих препаратов на иммунный статус практически здоровых лиц и при патологии. – Автореф. ... д-ра мед. наук. – Архангельск, 2001. – 36 с.
7. Вершинин А.О., Камнев А.Н. Механизмы противоопухолевой активности каротиноидов // Вопр. мед. химии. – 1996. – Т. 42, № 4. – С. 277.
8. Войткевич Е.Г., Шапкина М.Я., Златник Е.Ю. и др. Применение бета-каротина у больных раком легкого // I съезд онкологов стран СНГ. – М., 1996. – Ч. 2. – С. 372–3.
9. Газиев А.И. Ликопин-потенциальное средство профилактики рака и сердечно-сосудистых заболеваний // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. – 2001. – № 3. – С. 3–11.
10. Капитанов А.Б., Олферьев А.М., Пименов А.М. и др. Гиполипидемическое действие ликопина на развитие экспериментального атеросклероза у кроликов // Эксперим. кардиология. – 1997. – № 9. – С. 63–7.
11. Капитанов А.Б., Пименов А.М., Обухова Л.К. и др. Радиозащитная эффективность ликопина // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1994. – Т. 34, № 3. – С. 67–73.
12. Капитанов А.Б., Пименов А.М. Каротиноиды как антиоксидантные модуляторы клеточного метаболизма // Успехи соврем. биол. – 1996. – Т. 116, № 12. – С. 179–93.
13. Каротиноиды в онкологии / Сб. Матер. симпозиума РОНЦ РАМН. – М., 1992. – 154 с.
14. Кормош Н.Г. Роль антиоксидантов в комбинированном лечении рака яичников. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1997. – 24 с.
15. Коростелев С.А. Фармакология и механизм антиканцерогенного действия каротиноидов. Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2002. – 311 с.
16. Крылов И.А. Гастропротективная активность ликопина (экспериментальные исследования). – Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Курск, 2002. – 34 с.
17. Липатов О.Н. Клинико-биохимические и иммунологические параллели в комплексном лечении злокачественных лимфом у детей и подростков при применении бета-каротина. Дис. ... канд. мед. наук. – УФА, 1997. – 128 с.
18. Модестова А.В., Сторожаков Г.И., Новикова А.В. и др. Бета-каротин в лечении хеликобактерного гастрита // IV Рос. нац. конгресс «Человек и лекарство». – М., 1997. – С. 86.
19. Морозкина Н.В. Метаболическая реабилитация больных раком желудка с помощью антиоксидантов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Минск, 2000. – 23 с.
20. Раманаускайте Р.Ю. Использование бета-каротина для иммунокоррекции при комбинированной терапии злокачественных новообразований. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1994. – 26 с.
21. Рахимов Р.Р. Влияние синтетического бета-каротина на некоторые иммунологические показатели у женщин с предраком и раком молочной железы. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 1997. – 21 с.
22. Сергеев А.В., Ананьев В.С., Коростелев С.А., Шапкина М.Я. Фармацевтические и медико-биологические аспекты создания средств химиопрофилактики // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2001. – № 3. – С. 11–6.
23. Спиричев В.Б., Левачев М.М., Рымаренко Т.В. и др. Влияние приема масляного раствора бета-каротина на его уровень в сыворотке крови и антиоксидантный статус больных язвой желудка и 12-перстной кишки и эрозивным гастритом // Вопросы мед. химии. – 1992. – Т. 38, № 6. – С. 44–7.
24. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005 г. / Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2007. – Т. 18, № 2. – С. 8–9, 52.
25. Туманян А.О., Давыдова Т.В., Патютко Ю.И. и др. Роль антиоксидантной коррекции при симптоматическом лечении больных раком поджелудочной железы // Материалы IV съезда онкологов и радиологов СНГ, 28 сентября – 1 октября 2006 г. – Баку. – № 731. – С. 175.
26. Шапкина М.Я., Отарова С.М., Буюклинская О.В. и др. Изучение адаптогенного действия бета-каротина // Материалы III Росс. национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 1996. – С. 296.
27. Шапкина М.Я., Шапкин П.Н., Максимова М.В. и др. Радиопротекторная активность каротиноидов // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 40–1.
28. Шмак А.И. Профилактика развития местных рецидивов и отдаленных метастазов у операбельных больных раком желудка. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Минск, 2005. – 36 с.
29. Anderson M.L. A preliminary investigation of the Enzymatic inhibition of 5- α -reductase and Growth of Prostatic Carcinoma Cell Line LNCap-FGC by Natural astaxanthin and Saw Palmetto Lipid extract // J Herb. Pharmacother. – 2004. – 5(1). – P. 17–26.

30. *Bachmann H., Nemzek R., Coffey J.W.* β -carotene reduces paw swelling in the Rat Adjuvant Arthritis Model while Increasing IL-1 production in peritoneal Macrophages // *Carotenoids in Human Health*. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 270–3.
31. *Bianchi L., Bianchi A., Tateo F. et al.* Reduction of chromosomal damage by bleomycin in lymphocytes from subjects supplemented with carotenoids. Relevance in bleomycin tumour chemotherapy // *Boll. Chim. Farm.* – 1990. – 129(12). – P. 83s–87s.
32. *Burri B.J., Dixon Z.R., Fong A.K.H. et al.* Possible Association of skin lesions with a low-carotene diet in premenopausal women // *Carotenoids in Human Health*. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 279–80.
33. *Carotenoids in Human Health*. / Edited by *L.M. Canfield, N.I. Krinsky, J.A. Olson* // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1993. – Vol. 691. – P. 300.
34. *Chachkina M.Y., Muchamedganova D.M., Komov D.V. et al.* Modifiers of anticancer therapy // *XI Nat. Cancer Congress*. – Antalya, 1995. – P. 102.
35. *Collins A.R.* Carotenoids and genomic stability // *Mutat. Res.* – 2001. – 18. – 475 (1–2). – P. 21–8.
36. *Coodley G.O., Nelson H.D., Loveless M.O. et al.* Beta-carotene in HIV infection // *J Acquir. Immun. Def. Syndr.* – 1993. – 6. – P. 272–6.
37. *Dell'Orti M., Ollini C., Grossi L. et al.* Antigenotoxic activity of carotenoids in patients suffering from head and neck cancer and submitted to radiotherapy // *Med. Biol. Environ.* – 1992. – 20(2). – P. 342–8.
38. *Fiedor J., Fiedor L., Haessner R. et al.* Cyclic endoperoxides of beta-carotene potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2005. – Aug. 15. – 1709(1). – P. 1–4.
39. *Fuhrman B., Elis A., Aviram M.* Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages // *Biochem. and Biophys. res. communic.* – 1997. – 233. – P. 658–62.
40. *Galligan L.J., Jackson C.L., Gerber L.E.* Carotenoids slow the growth of small cell lung cancer cells // *Carotenoids in Human Health*. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 267–9.
41. *Garewal H.S.* Carotenoids in oral cancer prevention // *Carotenoids in Human Health*. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 139–47.
42. *Gaziano J.M., Hennekens C.H.* The role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease // *Carotenoids in Human Health*. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 148–55.
43. *Greenberg E.R.* Carotenoids, cigarette smoking and mortality risk // *Carotenoids in Human Health*. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 120–6.
44. *Grubbs C.J., Eto I., Juliana M.M. et al.* Effect of canthaxanthin on chemically induced mammary carcinogenesis // *Oncology*. – 1991. – 48. – P. 239–45.
45. *Handelman G.J.* The evolving role of carotenoids in human biochemistry // *Nutrition*. – 2001. – Oct. 17(10). – P. 818–22.
46. *Hasegawa T.* Anti-stress effect of beta-carotene // *Carotenoids in Human Health*. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 281–3.
47. *Heber D., Lu Q.Y.* Overview of mechanisms of action of lycopene // *Exp. Biol. Med.* – 2002. – Nov. 227(10). – P. 920–3.
48. *Hurst J.S., Saini M.K., Jin G.F. et al.* Toxicity of oxidized beta-carotene to cultured human cells // *Exp. Eye. Res.* – 2005. – Aug. 81(2). – P. 239–43.
49. *International Agency for Research on Cancer (IARC).* World Health organization. Handbooks of cancer prevention «Carotenoids». – Lyon, France, 1998. – Vol. 2. – 326 p.
50. *Khailenko V.A., Komov D.V., Sergeeva T.I. et al.* Previous results of using beta-carotene in patients with breast cancer // *8-Inthern. Congr. on Anti-Cancer Treatment 3–6 febr.* 1998. – Paris, France. – P. 288.
51. *Korostelev S.A., Shlyankevich M.A., Drize O.B. et al.* Antimutagenic and immunomodulating activity of carotene-tocopherole complex from rose's fruits // *XVI Intern. Cancer congress*. – New-Delhi, India. – 30 oct. – 5 nov. 1994. – PSB48–06.
52. *Krutovskikh V., Asamoto M., Takasuka N. et al.* Differential Dose-dependent effects of alpha, beta-carotenes and lycopene on Gap-junctional Intercellular Communication in Rat liver in vivo // *Jpn. J Cancer Res.* – 1997. – Dec. 88. – P. 1121–4.
53. *Lai Bai-tang et al.* Effects of beta-carotene on lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 1993. – 15(5). – P. 351–4.
54. *Levshin V., Drozhachikh V., Sergeev A. et al.* Study of lung Cancer Chemoprevention feasibility and effectiveness // *Theory and practice of Cancer Prevention Materials of Conferen. Internal.* Vilnius. – 1997. – P. 92.
55. *Liebler D.C.* Antioxidant reactions of carotenoids // *Carot. in Human Health*. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 20–31.
56. *Lipp Hans-Peter.* Neue therapeutische ansätze in der Behandlung von Tumoren // *Dtsch. Z. Oncol.* – 2004. – 36(2). – P. 52–6.

57. Luo Wenjing, Wenliang W., Bo L. et al. Inhibitory effects of beta-carotene on hepatic cancer cell line SMMC-7721 // J of Hygiene Res. – 2001. – 4. – P. 213–4.
58. Maccarrone M., Bari M., Gasperi V. et al. The photoreceptor protector zeaxanthin induces cell death in neuroblastoma cells // Anticancer Res. – 2005. – 25. – P. 3871–76.
59. Muzandu K., Bohi K.E., Shaban Z. et al. Lycopene and beta-carotene ameliorate catechol estrogen-mediated DNA damage // Jpn. Vet. Res. – 2005. – 52(4). – P. 173–84.
60. Narisawa T., Fukaura Y., Oshima S. et al. Chemoprevention by oxygenated carotenoid beta-cryptoxanthin of N-Methylnitrosourea-induced Colon Carcinogenesis in F₃₄₄ Rats // Jpn. J Cancer. – 1999. – 90. – P. 1061–65.
61. Nishino H., Jinno K. Prevention of hepatitis C virus-induced liver cancer by natural carotenoids and vitamin E // Proceedings of Frontiers in Cancer Prevention Res. AACR Conference. – 2002. – 107. – P. 202.
62. Nishino H., Jinno K. Compositions for prevention Human cancer and method of Preventing Human Cancer // EP 1470817. – 24.10.2004. – Bull 2004/44.
63. Packer L. Antioxidant Action of Carotenoids in vitro and in vivo and Protection against oxidation of Human Low-Density Lipoproteins // Carotenoids in Human Health. – 1993. —Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 48–60.
64. Palozza P. Can beta-carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – May 30. – 1740(2). – P. 215–21.
65. Pastori M., Pfander H., Boscoboinik D. et al. Lycopene in association with alpha-tocopherol inhibits at physiological concentrations proliferation of prostate carcinoma cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – Sep. 29. – 250(3). – P. 582–5.
66. Prabhala R.H., Braune L.M., Garewal H.S. et al. Influence of beta-carotene on immune functions // Carotenoids in Human Health. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 262–3.
67. Prakash P., Manfredi T.G., Jackson C.L. et al. Beta-carotene alters the morphology of NCI-H69 small cell lung cancer cells // J Nutr. – 2002. – Jan. 132(1). – P. 121–124.
68. Rao A.V. Lycopene, tomatoes and the prevention of coronary heart disease // Exp. Biol. Med. – 2002. – Nov. 227(10). – P. 908–13.
69. Rebrin I., Zicker S., Wedekind K.J. et al. Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence – accelerated mouse // Free Radic. Biol. Med. – 2005. – Aug. 15. – 39(4). – P. 549–57.
70. Santamaria L., Bianchi-Santamaria A. Carotenoids and vitamin A in prevention, adjuvant cancer therapy, mastalgia treatment and AIDS-related complex // Carotenoids in Human Health. – 1993. – Ann. NYAS. – Vol. 691. – P. 255–8.
71. Sato R., Helzlsouer K.J., Alberg A.J. et al. Prospective study of carotenoids, tocopherols and retinoid concentrations and the risk of breast cancer // Cancer Epidem. Biomark. Prev. – 2002. – 11(5). – P. 451–7.
72. Schweigert F.J. Inflammation-induced in the nutritional biomarkers serum retinol and carotenoids // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2001. – Nov. 4(6). – P. 477–81.
73. Stahl W., Sies H. Carotenoids and protection against solar UV radiation // Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. – 2002. – 15(5). – P. 291–6.
74. Vizer G., Feher J. The role of alimentary oxydants and antioxidants in carcinogenesis // Orv. Hetil. – 2001. – Jul. 29. – 142(30). – P. 1605–9.
75. Wertz K., Siler U., Goralszyk R. Lycopene: modes of action to promote prostate health // Arch. Biochem. and Biophys. – 2004. – 430(1). – P. 127–34.
76. White W.S., Kim C., Kalkwarf H.J. Ultraviolet light-induced reductions in plasma carotenoid levels // Am. J Clin. Nutr. – 1988. – 47. – P. 879–83.
77. Young A.J., Lowe G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – Jan. 1. – 385(1). – P. 20–7.
78. Zhang Jing, Zhang Jun, Zhao Y. et al. Влияние бета-каротина и витамина С на экспрессию С-тус в клетках лейкоза человека // РЖ. «Биология. Онкология. Терапия опухолей». – 2003. – № 10. – 03.10.04 Н 3.87.; J Hyg. Res.. – 2001. –3. – P. 160–2.

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

УДК 618.15-006.448-073.43

*М.А. Чекалова, Л.К. Мнацакян, В.В. Кузнецов, Т.И. Захарова, Е.К. Дворова, О.В. Камаева, А.А. Кузумова***ВОЗМОЖНОСТИ ЭХОГРАФИИ****ПРИ ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАЗОВ ЛЕЙОМИОСАРКОМ ТЕЛА МАТКИ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация*Мнацакян Лусине Карленовна, врач отделения гинекологии НИИ клинической онкологии, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(926)372-82-58**e-mail:** lusmnats@mail.ru

Статья поступила: 20.10.2009, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

Материалом исследования явились результаты обследования 24 больных лейомиосаркомой (ЛМС) тела матки, которые лечились и наблюдались в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 1996–2006 гг. Эхографическая картина метастазов ЛМС тела матки характеризовалась такими же признаками, как и первичная опухоль – преобладали отражения пониженной интенсивности. Проведение эхографии позволяет уточнить диагноз и получить полноценное представление о местно-регионарном распространении ЛМС матки.

Ключевые слова: ультразвуковая диагностика, лейомиосаркома тела матки, метастазы лейомиосарком.*M.A. Chekalova, L.K. Mnatsakanyan, V.V. Kuznetsov, T. Zakharova, E.K. Dvorova, O.V. Kamaeva, A.A. Kuzumova***THE CAPABILITY OF ECHOGRAPHY****IN DIAGNOSIS OF PATIENTS WITH LEIOMYOSARCOMA UTERI**

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

Abstract

The study was based on results of 24 patients with leiomyosarcoma uteri treated at the Russian Cancer Research Center between 1996–2006. We observed that echography of metastasis in patients with leiomyosarcoma uteri is the same as in primary tumor with the prevail of reverberation of reduced intensity. The introducing of supplemental diagnostic tool, echography, allows to correct the diagnosis and to have the objective picture of local spreading of leiomyosarcoma uteri.

Key words: ultrasound diagnosis, leiomyosarcoma uteri, metastasis.**Введение**

Достаточно редкими, но крайне злокачественными опухолями матки являются саркомы, полиморфизм которых сочетается со скудностью клинических симптомов. Эти опухоли характеризуются плохим прогнозом.

В среднем продолжительность жизни от момента установления диагноза составляет 1–2 года, а пятилетняя выживаемость больных саркомой матки не превышает 60 % [2]. ЛМС составляет около 1,3 % всех злокачественных новообразований матки и около трети всех сарком матки (СМ). По данным S. Leibsohn et al. (1990), ЛМС является одной из 800 гладкомышечных опухолей матки [3].

ЛМС отличается своим крайне агрессивным течением. Выживаемость при этой злокачественной опухоли значительно ниже, чем при эндометриальной стромальной саркоме (ЭСС) [4].

По данным Larson B. (1990), 5-летняя выживаемость среди больных ЛМС составляет не более 15 % [4–7]. По данным Н.И. Лазаревой (2003), 5-летняя общая и безрецидивная выживаемость больных ЛМС матки составляет 48,5±4,2 и 44,3±4,3 % соответственно [1]. Отдаленные метастазы после проведенного лече-

ния выявляются у 53,4 % больных ЛМС. Возможны любые пути распространения: внутрибрюшинно, лимфогенно и гематогенно, в частности – в легкие, печень, головной мозг, почки и кости [3]. Чаще ЛМС метастазирует в легкие (50,6 %). При этом прогрессирование проявляется только метастазами в легких у 52,3 % больных, у 47,7 % – метастазы в легких сочетаются с метастазами в других органах. На втором месте по частоте метастазирования находятся лимфатические узлы таза и поясничной области, а также брыжейки толстой или тонкой кишки. По результатам Н.И. Лазаревой (2000), у 49,4 % больных ЛМС выявляются метастазы в перечисленных выше лимфатических узлах. У 25,3 % больных ЛМС прогрессирование заболевания проявляется опухолевой диссеминацией по брюшине и асцитом, у 8,0 % – специфическим плевритом [1].

Из-за скудной специфической симптоматики ЛМС нередко обнаруживают тогда, когда имеет место распространенный процесс (метастазы в легких, печени, подвздошных лимфатических узлах). Не вызывает сомнений тот факт, что правильное определение характера распространения опухоли способствует адекватному и своевременному планированию лечения. В связи с чем целесообразно изучение возможностей эхографии при диагностике метастазов ЛМС матки.

Материалы и методы

Материалом исследования явились результаты обследования 24 больных ЛМС тела матки, которые лечились и наблюдались в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 1996–2006 гг. Всем больным проведено клиническое обследование, включавшее сбор анамнеза и физикальный осмотр; визуальный осмотр шейки матки в зеркалах и бимануальное влагалищное исследование, обследование и ультразвуковой мониторинг. Ультразвуковое (УЗ) исследование проводилось по стандартной методике трансабдоминальным и трансвагинальным доступами. В полном объеме обследованы внутренние гениталии, брюшная полость и забрюшинное пространство.

Результаты и обсуждение

В соответствии с морфологической классификацией сарком больные распределены следующим образом: у 6 (25 %) больных гистологически выявлена высокодифференцированная ЛМС, у 8 (33,3 %) – умереннодифференцированная, у 10 (41,7 %) – низкодифференцированная.

При гистологическом исследовании послеоперационного материала инвазия опухоли в миометрий отсутствовала в 13 случаях (54,2 %), в эту группу входили также случаи, где ЛМС была представлена опухолью в узлах без признаков инвазии. Инвазия опухоли до половины миометрия имела место в 3 наблюдениях (12,5 %). Инвазия на глубину более половины миометрия выявлена у 8 больных (33,3 %), в том числе в двух случаях опухоль прорастала до серозы.

Средний возраст больных составил 51,4 ± 1,9 года (32–65). 10 (41,7 %) больных находились в репродуктивном, 2 (8,3 %) – в перименопаузальном, 12 (50,0 %) – в постменопаузальном периодах жизни.

По данным проведенного комплексного обследования в 62,5 % (15 из 24) наблюдений отсутствие метастазов при УЗТ подтвердилось. Практически с одинаковой частотой встречались как локализованные, так и диссеминированные формы заболевания ($p=0,4$). В 37,5 % (9) наблюдений больные обратились с распространенным процессом.

У 5 женщин (20,8 %) выявлены отдаленные метастазы:

- в легких – у 8,3 % (2),
- в печени – у 8,3 % (2).

У 4 женщин (16,7 %) выявлены регионарные метастазы:

- в подвздошных лимфатических узлах – в 13 % (3) случаев,
- в большом сальнике – в 4,2 % (1) случаев.
- в маточной трубе в 4,2 % (1) случаев.

В нашем исследовании гораздо чаще (почти в 3 раза) были обнаружены метастазы при низко- (40 %; 4 из 10) и умереннодифференцированных (50 %; 4 из 8) ЛМС, чем высокодифференцированных ЛМС (16,7 %; 1 из 6) ($p=0,4$).

Ультразвуковым методом метастазы выявлены у четырех больных: у 2 диагностированы метастазы в печени, у 2 – в подвздошных лимфатических узлах (рис. 1–2). Эхографическая картина характеризовалась такими же признаками, как и первичная опухоль – преобладали отражения пониженной интенсивности.

Причем следует отметить, что метастазы диагностированы при новообразованиях различных размеров, в том числе и при небольшой (5–6 см в диаметре) опухоли.

Приведем клинический пример:

Больная Ф., 32 лет, обратилась в РОНЦ с жалобами на ациклические кровянистые выделения из половых путей. По месту жительства было выполнено РДВ полости матки, при гистологическом исследовании тканевого материала элементов опухоли не было найдено. При УЗИ в поликлинике РОНЦ: матка увеличена, по левому ребру определяется интерстициальный узел размером 3,3×2,7×3 см, деформирующий контур полости матки, эндометрий толщиной 1 см, выявлена дермоидная киста левого яичника диаметром 5 см, справа придатки не изменены. Заключение: миома матки, дермоидная киста левого яичника. При контрольном УЗИ через 1,5 мес. отмечалось увеличение размеров матки, а также увеличение узла до 4,5 см в диаметре (рис. 3), структура его изменилась, появились гипозоногенные разводы, обильная васкуляризация (рис. 4), слева у стенки таза был выявлен аналогичный по структуре увеличенный лимфатический узел размером 2,6×1,7 см (рис. 5), размеры дермоидной кисты левого яичника остались прежними. Заключение: подозрение на саркому матки, метастаз в подвздошный лимфатический узел. При гинекологическом осмотре: слизистая шейки матки и влагалища не изменены. При ректовагинальном исследовании: тело матки немного увеличено в размерах, слева от матки пальпировалось образование тугоэластической консистенции до 6 см в диаметре. Больной произведена операция экстирпации матки с придатками с двусторонней лимфаденэктомией. При вскрытии брюшной полости выявлено: матка увеличена до 9–10 недель беременности, из левого яичника исходит гладкостенное образование до 8 см в диаметре, правый яичник не изменен. Макропрепарат – матка неправильной формы размером 10 × 6 см. Эндометрий и шейка гладкие, серовато-розового цвета. В миометрии узелки дольчатого строения с участками миксоматоза, некроза, кровоизлияний диаметром 4,5 см, сливающиеся в конгломераты с врастанием в полость матки в виде полипа размером 1,5×0,7 см. Микроописание: шейка матки выстлана многослойным плоским эпителием. Эндометрий атрофичный. Узел в миометрии имеет строение лейомиосаркомы с участками некроза, врастанием в полость матки в виде полиповидного образования с признаками нарушения микроциркуляции. Правый яичник и лимфоузел справа – без элементов опухолевого роста. В левом яичнике зрелая тератома. В лимфатическом узле слева – метастаз лейомиосаркомы. В последующем больная получала химиолучевое лечение. Спустя 24 мес после завершения лечения констатировано прогрессирование процесса в виде появления метастазов в печени, лимфатических узлах брюшной полости и надключичной зоны.

Особенность приведенного наблюдения: саркома матки была обнаружена при динамическом наблюдении за больной с диагнозом «миома матки» на доклинической стадии. Следовательно, имеется возможность активного выявления саркомы матки ультразвуковым методом. В то же время данный случай является наглядной демонстрацией того, насколько агрессивна ЛМС: несмотря на сравнительно небольшие размеры (5 см в диаметре) опухоли, у больной выявлены метастазы в подвздошных лимфатических узлах.

После лечения все обследуемые больные наблюдались в поликлинике РОНЦ, где проводился ультразвуковой мониторинг. У 6 из 24 (25 %) больных ЛМС метастазы развились в сроки от 3 до 24 мес.

У 2 больных метастазы выявлены в сроки до 1 года, у 2 – в течение 2-го года наблюдения и у 2 в сроки от 2 и более лет. У 3 (50 %) больных ЛМС тела матки после лечения проявились единичные и множественные метастазы, преимущественно – по висцеральной и париетальной брюшине (рис. 6), у 2 – в легких (33,3 %), у 1 – в печени, у 1 – в подвздошных лимфатических узлах, у 1 – в лимфатических узлах брыжейки тонкой и толстой кишки.

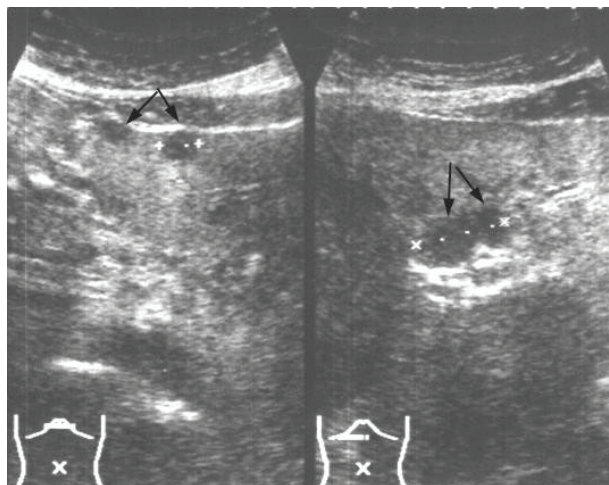


Рис. 1. Ультразвуковая томограмма больной ЛМС с метастазом в печени, выполненная трансабдоминальным доступом в поперечной плоскости.



Рис. 2. Ультразвуковая томограмма больной ЛМС с метастазами в печени, выполненная трансабдоминальным доступом в поперечной плоскости.

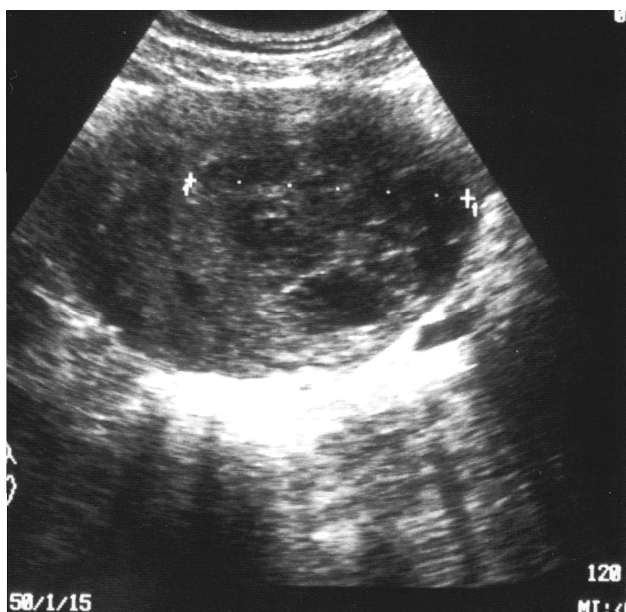


Рис. 3. Ультразвуковая томограмма больной ЛМС, выполненная трансабдоминальным доступом в поперечной плоскости.

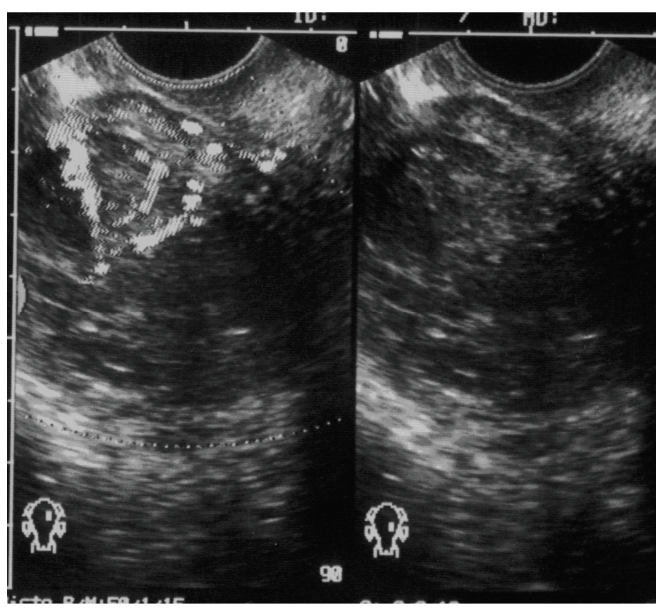


Рис. 4. Ультразвуковая томограмма больной ЛМС, выполненная трансвагинальным доступом в поперечной плоскости.

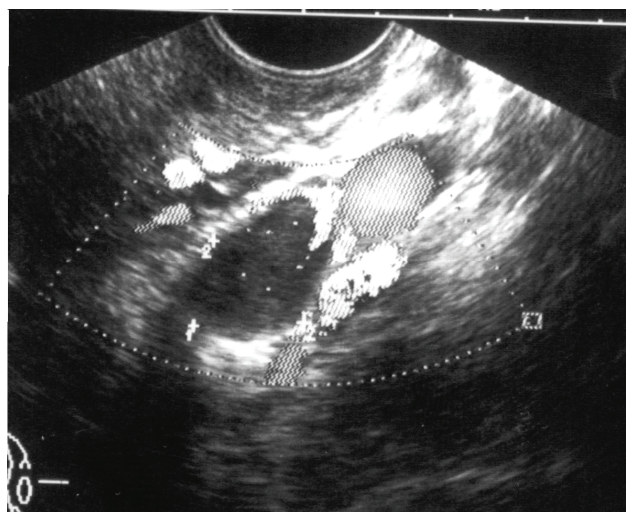


Рис. 5. Ультразвуковая томограмма больной ЛМС с метастазами в подвздошных лимфатических узлах, выполненная трансабдоминальным доступом в поперечной плоскости.

Для ЛМС характерно относительно медленное прогрессирование процесса. У 50 % больных после проведенного лечения метастазы возникают в течение первых трех лет вне зависимости от морфологической структуры опухоли и стадии заболевания. Можно предположить, что уже до начала лечения около 30 % женщин, страдающих саркомами матки, имеют скрытые метастазы без клинических проявлений [8]. Нередко у этой категории больных проявление отдаленных метастазов опухоли исчисляется годами. У каждой второй пациентки с ЛМС при прогрессировании болезни обнаруживают метастазы в легких, которые в ряде случаев выявляются до установления диагноза СМ. Данные аутопсий умерших больных ЛМС показывают наличие множественных метастатических опухолей в органах грудной (включая перикард, миокард, средостение) и брюшной полостях, различных участках головного мозга, мягких и костных тканях, которые при клиническом обследовании больных по поводу рецидива заболевания не выявлялись.

Литература

1. Лазарева Н.И. Злокачественные мезенхимальные опухоли женских половых органов (клиника, диагностика, лечение, факторы прогноза). Дис. ... д-ра мед. наук. М, 2000. – С. 226–46.
2. Чекалова М.А. Ультразвуковая диагностика злокачественных новообразований матки. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 1998. – 165 с.
3. Leibsohn S., d'Ablaing G., Mischell D.R. Jr, Schlaerth J.B. Leiomyosarcoma in a series of hysterectomies performed for presumed uterine leiomyomas//Am. J. Obstet. Gynecol. – 1990. – 162. – P. 968–74.
4. Larson B., Silfversward C., Nilsson B. et al. Prognostic factors in uterine leiomyosarcoma. A clinical and histopathological study of 143 cases. The Radiumhemmet series 1936-1981 // Acta Oncol. – 1990. – 29. – P. 185–91.
5. Major F.J., Blessing J.A. Silverberg S.G. et al. Prognostic factors in early-stage uterine sarcoma//Cancer. – 1993. – 71. – P. 1702–9.
6. Nordal R.R., Kristensen G.B., Kaern J. et al. The prognostic significance of stage, tumor size, cellular atypia and DNA ploidy in uterine leiomyosarcoma//Acta Oncol. – 1995. – 34. – P. 797–802.
7. Pautier P., Genestie C., Rey A. et al. Analysis of clinicopathologic prognostic factors for 157 uterine sarcomas and evaluation of a grading score validated for soft tissue sarcoma // Cancer (Phila). – 2000. – 88(6). – P. 1425–31.
8. Valera-Duran J., Nochomovitz L.E., Prem K.A. et al. Postirradiation mixed mullerian tumors of the uterus // Cancer. – 1980. – 45. – P. 1625–31.

На основании этих фактов предполагается, что ЛМС является системным заболеванием, патогенез которого остается неясным.

Проблемы ранней диагностики ЛМС матки и мониторинга при данной патологии до сих пор остаются нерешенными.

Практическая важность этой задачи очевидна, поскольку лечение заболевания в начальных стадиях обеспечивает наилучшие результаты при малых экономических затратах [8].

Выводы

Проведение эхографии позволяет клиницистам уточнить диагноз и одновременно получить дополнительную информацию о распространении ЛМС матки. Эти данные в совокупности с клиническими и лабораторными способствуют своевременному и адекватному планированию тактики ведения больной.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

УДК 616.33-006.6-08:575.224.088

*Н.А. Шаназаров¹, А.Х. Сабиров¹, А.Г. Синяков², А.В. Симонов², Н.С. Райков², Е.В. Сидоров¹, О.С. Велижанина¹***ЗНАЧИМОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ****В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА**¹ГОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия Росздрава»²ГЛПУ ТО Областной онкологический диспансер, Тюмень**Контактная информация***Сабиров Ахат Халимович, доцент кафедры онкологии ГОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия Росздрава»***адрес:** 625039, Тюмень, 50 лет Октября, 47/2; **тел.:** +7(3452)41-09-36, **моб.:** +7(912)921-22-22**e-mail:** sabirov58@mail.ru

Статья поступила: 20.10.2009, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

В статье представлены результаты изучения частоты встречаемости молекулярно-генетических маркеров при раке желудка, частоты экспрессии общебиологических маркеров, характеризующих «поведение» опухолевой клетки, их корреляцию с агрессивностью опухоли и прогнозом. Изучены материалы о 54 первичных больных раком желудка. По результатам исследования следует, что мутационный статус по парафиновым образцам опухоли и плазме крови, уровни EGFRs и VEGFRs, индекс пролиферативной активности Ki-67 могут являться маркерами для оценки эффективности проводимой терапии и определения полноты излеченности больных РЖ специальными методами противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: рак желудка, общебиологические маркеры, мутационный статус, EGFR, VEGFR, Ki-67.*N.A. Shanazarov¹, A.Kh. Sabirov¹, A.G. Sinyakov², A.V. Simonov², N.S. Raikov², E.V. Sidiriv¹, O.S. Velizhanina¹***THE SIGNIFICANCE OF BIOMARKER IDENTIFICATION
IN TREATMENT OF PATIENTS WITH STOMACH CANCER**¹The Tumen Medical State University²The Region Cancer Center, Tumen**Abstract**

In this study we have examined the expression of biomarkers associated with the «behavior» of cancer cell and also the stomach cancer specific marker expression. We have analyzed the correlation of above mentioned biomarkers with the aggressiveness of tumor and their possible prognostic significance. 54 patients with different stage of stomach cancer were enrolled in the study. Here we show that the level of EGFRs, VEGFRs and Ki-67 in blood plasma and their identification by immunohistochemical analysis on slides are essential marker to follow up the treatment of stomach cancer patients.

Key words: stomach cancer, biomarker, EGFR, VEGFR, Ki-67.**Введение**

Несмотря на стабильное снижение заболеваемости, рак желудка по-прежнему остается актуальной проблемой современной онкологии [2]. Длительное время РЖ – ведущая причина в структуре смертности от онкологической патологии во всем мире [7].

В России ежегодно регистрируется около 38 000 новых случаев РЖ, причем более 54 % больных погибают в течение первого года [2; 7]. В Тюменской области заболеваемость РЖ за последние 10 лет снизилась с 20,3 до 17,5 на 100 000 населения; в 2008 г. выявлены 574 случая. Особое значение в настоящее время придается ранней диагностике и лечению РЖ, возможности предупредить прогрессирование заболевания [6]. При этом даже при наличии признаков метастазирования в регионарных лимфатических узлах показано радикальное оперативное вмешательство, в то время как при отдаленных метастазах оправданы лишь паллиативные операции, позволяющие улучшить качество жизни пациентов. Современные методы позволяют с высокой точностью определить наличие, степень распространения и уровень дифференцировки первичной опухоли, однако в настоящее время отсутствует достаточное количество методов для оценки полноты излеченности, раннего выявления отдаленных

метастазов [1; 5]. Таким образом, в ряду наиболее важных проблем онкологии представляется весьма актуальной задача изучения диагностической и прогностической значимости некоторых маркеров канцерогенеза: частоты выявления и определения уровней рецепторов EGFR, антигена Ki-67, определяемых иммуногистохимически и иммуносорбентными методами, и мутаций в некоторых онкогенах при развитии рака желудка у человека. Последние, наряду с другими онкогенами, супрессорными генами и секреторными белками, рассматриваются в качестве перспективных маркеров, характеризующих биологическое поведение опухоли и позволяющих индивидуализировать подходы к назначению терапии больным РЖ [4]. Однако, несмотря на довольно значительное количество исследований EGFR, VEGFR, антигена Ki-67 и мутаций в некоторых онкогенах, однозначного ответа на вопрос о значении этих онкомаркеров при развитии РЖ у человека до настоящего времени пока не получено [3]. В литературе практически не описана роль и значение свободнорастворимых в сыворотке крови форм рецепторов ростовых факторов в канцерогенезе РЖ. Исследование молекулярных механизмов пролиферативных (гиперпластических) процессов и поиск путей их фармакологической коррекции является одной из самых динамично развивающихся областей современной молекулярной медицины [1; 3; 4].

Таблица 1

Стадии РЖ у больных, включенных в исследование

Стадия	TNM-классификация	Количество больных
Iв	T ₂ N ₀ M ₀	4 (7,4 %),
II	T ₂ N ₁ M ₀ , T ₃ N ₀ M ₀	10 (18,5 %),
IIIа	T ₂ N ₂ M ₀ , T ₃ N ₁ M ₀	19 (35,2 %),
IIIв	T ₃ N ₂ M ₀	8 (14,8 %)
IV	T ₄ N ₁ M ₀ , T ₄ N ₂ M ₀ , T ₄ N ₃ M ₀ , T ₁₋₄ N ₀₋₃ M ₁	13 (24,1 %)
Всего		54 (100 %)

Таблица 2

Распределение больных с выявленными мутациями в различных генах в зависимости от степени дифференцировки опухоли в парафиновых образцах

Парафиновые образцы	ДНК		ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	Всего (n=54)
	p53	5 экзон	2	3	6	11
		6 экзон	3	1	15	19
		7 экзон	6	7	26	39
		8 экзон	5	4	11	20
	C-kit		–	1	6	7
	B-raf		1	4	5	10
	APC		5	9	24	38
	K-ras		–	4	16	20
	E-cadherin		–	2	–	2
p16		–	3	8	11	
Ki -67	>35 %	8	1	–	9	
	>50 %	1	8	5	14	
	>70 %	1	2	28	31	

Таблица 3

Распределение больных в зависимости от экспрессии ростовых факторов EGFR и VEGFR и степени дифференцировки опухоли в сыворотке крови

Сыворотка	Маркер	Значение	ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	Всего (n=54)
	EGFR (N = 0–9,5)	>9,5 нг/мл	8	9	–	17
		>15 нг/мл	2	2	1	5
		>20 нг/мл	–	–	32	32
	VEGFR (N = 0–120)	>120 нг/мл	–	1	–	1
		>140 нг/мл	–	9	3	12
		>160 нг/мл	–	1	29	30

Таблица 4

Распределение больных с выявленными мутациями в различных генах в зависимости от степени дифференцировки опухоли в плазме крови

Плазма крови	ДНК		ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	Всего (n=54)
	p53	5 экзон	2	2	4	8
		6 экзон	3	–	15	18
		7 экзон	6	7	26	39
		8 экзон	4	4	8	16
	C-kit		–	1	6	7
	B-raf		1	4	5	10
	APC		4	7	19	32
	K-ras		–	3	11	14
	E-cadherin		–	2	–	2
p16		–	2	5	5	

Таблица 5

Динамика количества мутаций в плазме крови при молекулярно-генетическом исследовании

Плазма крови	ДНК		До лечения			После лечения		
			ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)
	p53	5 экзон	2	2	4	–	–	2
6 экзон		3	–	15	–	–	7	
7 экзон		6	7	26	–	1	11	
8 экзон		4	4	8	–	1	5	
C-kit		–	1	6	–	–	3	
B-raf		1	4	5	–	1	2	
APC		4	7	19	–	–	2	
K-ras		–	3	11	–	–	4	
E-cadherin		–	2	–	–	–	–	
p16		–	2	5	–	–	–	

Таблица 6

Динамика экспрессии рецепторов ростовых факторов (EGFR и VEGFR) в сыворотке крови

Сыворотка	Маркер	Значение	До лечения			После лечения		
			ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)
	EGFR (n=0–9,5)	≥9,5 нг/мл	8	9	–	–	–	–
≥15 нг/мл		2	2	1	–	2	–	
≥20 нг/мл		–	–	32	–	–	11	
VEGFR (n=0–120)	≥120 нг/мл	–	1	–	–	–	–	
	≥140 нг/мл	–	9	3	–	2	1	
	≥160 нг/мл	–	1	29	–	–	11	

Понимание базисных основ индукции клеточного роста, особенно в условиях опухолевой трансформации клеток, является неотъемлемой частью грамотного подхода к управлению и мониторингованию пролиферативной активностью.

Цель исследования – изучение частоты встречаемости молекулярно-генетических маркеров при РЖ, частоты экспрессии общебиологических маркеров, характеризующих «поведение» опухолевой клетки, их корреляцию с агрессивностью опухоли и прогнозом.

Материалы и методы

В исследование включены 54 первичных больных РЖ, прошедших обследование и лечение на базе Тюменского областного онкологического диспансера, ООО «Центр молекулярно-генетической диагностики Сабинова А.Х.» и лаборатории ИГХ Тюменского областного онкологического диспансера. Всем больным (женщин 7; 13 %; мужчин 47; 87 %) проведено оперативное лечение и ПХТ. Данные о стадировании представлены в табл. 1. Гистологически у всех пациентов выявлена аденокарцинома различной степени дифференцировки:

- высокодифференцированная (ВДА) – у 10 (18,5 %);
- умереннодифференцированная (УДА) – у 11 (20,4 %);
- низкодифференцированная (НДА) – у 33 (61,1 %).

У преобладающего количества больных на момент диагностики была выявлена III – IV стадия опухолевого процесса – 74,1 %. Определение уровня экспрессии свободнорастворимых форм EGFR и VEGFR в сыворотке крови проводили с помощью ИФА в модификации ELISA с использованием тест-наборов BioSource International, Inc, кат. №№ KHG0111, KHG0061. Уровень экспрессии антигена Ki-67 определяли в клетках опухоли с помощью ИГХ с использованием тест-наборов фирмы «Дасо»; материалом для молекулярно-генетического исследования послужили клетки опухоли и плазма крови. Выделение ДНК проводили с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Наличие мутаций определяли в онкогенах *p53* (5–8 экзоны), *C-kit*, *B-raf*, *APC*, *K-ras*, *E-cadherin* и *p16* с использованием специально подобранных праймеров.

Выводы

1. Низкая степень дифференцировки опухолевой клетки коррелирует с высоким индексом пролиферативной активности Ki-67.
2. Низкая степень дифференцировки опухолевой клетки коррелирует с высоким уровнем EGFRs.
3. Низкая степень дифференцировки опухолевой клетки коррелирует с высоким уровнем VEGFRs.
4. В результате лечения происходит снижение количества мутаций и уровней EGFRs и VEGFRs.
5. Мутация гена *p53* в 7 экзоне выявлена в большинстве случаев у больных с низкодифференцированной аденокарциномой, высоким уровнем EGFR и VEGFR и высоким индексом пролиферативной активности клеток, что является маркером высокой агрессивности опухоли и плохого ответа опухоли на проводимое лечение.
6. Мутационный статус по парафиновым образцам опухоли и плазме крови, уровень EGFRs и VEGFRs, индекс пролиферативной активности Ki-67 могут являться маркерами для оценки эффективности проводимой терапии и определения полноты излеченности больных РЖ после специальных методов противоопухолевого лечения.

Литература

1. Белявская В.А., Вардосанидзе В.К., Смирнова О.Ю. и др. Генетический статус p53 при раке желудка: соматические мутации и полиморфизм кодона 72 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 2. – С.202–4.
2. Гарин А. М., Базин И. С. Десять наиболее распространенных злокачественных опухолей. – М.: ККМ, 2006. – 266 с.
3. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. – М.: «Медицина», 2004. – 575 с.
4. Киселев В.И., Муйжнек Е.Л. Общие принципы профилактики метастатической болезни и сенсбилизации опухолей. – М.: Компания Димитрейд График Групп, 2007. – 125 с.
5. Петросян А.М., Харченко В.З. Изменения протеиназ ингибиторной системы у больных раком желудка // Онкология. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 303–6.
6. Слинчак С.М. Рак желудка. – Киев: Здоров'я, 1972. – 200 с.
7. Состояние онкологической помощи населению России в 2008 году. Под редакцией В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий, 2009. – 192 с.

Результаты анализа верифицировали прямым секвенированием полученных фрагментов ПЦР. Исследование проводилось непосредственно после выполнения оперативного вмешательства а также после окончания полного курса лечения (операция + адъювантная ХТ ПХТ по стандартным схемам).

Результаты

В ДНК, выделенной из парафиновых образцов опухолевой ткани, выявлены многочисленные мутации в различных онкогенах: *p-53* (ex 5–8), *C-kit*, *B-raf* (15 кодон), *APC*, *K-ras* (12 кодон), *E-cadherin*, *p-16*. Наибольшее количество мутаций выявлено в *p-53*, особенно в 7 экзоне (табл. 2). Индекс пролиферативной активности Ki-67 имеет наибольшее значение у пациентов с низкой степенью дифференцировки опухолевых клеток, что коррелирует с литературными данными. Свободнорастворимая фракция эпидермального фактора роста и сосудистого эндотелиального фактора роста, выделенная из сыворотки крови, наиболее выражена у пациентов с низкодифференцированной аденокарциномой, высоким индексом пролиферативной активности и у больных, имеющих мутацию в 7 экзоне гена *p53*, что также является маркером агрессивности и метастатической активности этих клеток (табл. 3). Мутации в генах определялись в ДНК, выделенной из парафиновых образцов опухоли и плазме крови. Следует отметить, что генетическая картина, полученная из ДНК парафиновых образцов опухоли, коррелировала с генетической картиной, выделенной в плазме крови (табл. 4). По представленным в табл. 4 данным видно, что максимальное кол-во мутаций в ДНК определено у больных с низкодифференцированной аденокарциномой. Для определения наличия изменений в генетическом статусе нами проведено молекулярно-генетическое исследование плазмы крови больных РЖ после комбинированного лечения. Результаты молекулярно-генетического исследования после окончания лечения показали достоверное снижение количества мутаций (табл. 5). По представленным данным в табл. 5 следует, что количество мутаций в генах, определенных до лечения, снизилось во всех группах исследования больных. Такая же тенденция отмечена при определении экспрессии рецепторов ростовых факторов в сыворотке крови (табл. 6).

УДК 618.19-006.6-071:612.119:611.018.74

Т.Т. Березов¹, Л.К. Овчинникова², О.М. Кузнецова¹, З.К. Карабекова², И.К. Воротников², М.В. Гришкевич²,
А.А. Тулеуова², И.В. Терешкина², У.Р. Мамедов², Е.К. Дворова²

ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Российский университет дружбы народов, Москва
²РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация

Березов Темирболат Темболатович, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии
Российского Университета дружбы народов

адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6; тел.: +7(495)434-04-12

e-mail: olya.k@mail.ru

Статья поступила: 03.02.2010, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

Изучали исходные (до лечения) уровни VEGF в сыворотке крови 248 больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий и 55 практически здоровых женщин (группа контроля). Средний показатель VEGF в сыворотке крови общей группы больных РМЖ достоверно выше, чем в таковой контроля. При стадии РМЖ T₂N₀M₀ отмечено более частое (25,0%), по сравнению со стадией T₁N₀M₀ (13,2%), выявление повышенных уровней VEGF относительно его порогового значения (≥300 пг/мл). Показатели VEGF у больных РМЖ не зависели от возраста и репродуктивной функции пациенток, рецепторного статуса опухоли (РЭ, РП). Уровни VEGF достоверно выше у больных при дольковом инфильтративном РМЖ, по сравнению с таковым при протоковом раке и при низкодифференцированных опухолях, чем при высоко- и умеренно дифференцированных. Среди больных РМЖ с рецидивом заболевания в первые 3 года наблюдения наиболее часто выявляли высокие (≥300 пг/мл) исходные уровни VEGF, по сравнению с пациентками, у которых за данный период не было выявлено рецидива опухоли (p=0,001). Полагаем, что показатель VEGF до лечения в сыворотке крови больных РМЖ при T₂N₀M₀ стадии можно использовать с целью уточнения прогноза развития раннего (в первые 3 года наблюдения) рецидива заболевания как дополнительного маркера наряду с общепринятыми клинико-морфологическими признаками болезни.

Ключевые слова: рак молочной железы, T₁₋₂N₀M₀ стадии, VEGF, сыворотка крови, прогноз.

T.T. Berezov¹, L.K. Ovchinnikova², O.M. Kuznetzova¹, Z.K. Karabekova², I.K. Vorotnikov², A.A. Tuleuova²,
M.V. Grishkevich², I.V. Tereshkina², U.R. Mamedov²

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN THE SERUM BREAST CANCER PATIENTS

¹Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

Abstract

Here we present the results of comparative immunoenzyme assay of the initial serum levels of VEGF in breast cancer patients (stages T₁N₀M₀ and T₂N₀M₀) and apparently healthy women (controls). It was found that VEGF concentrations in the serum of patients with breast cancer stages T₁N₀M₀ and T₂N₀M₀ significantly surpassed the control levels. Increased levels of VEGF surpassing the threshold values were more often observed in patients with T₂N₀M₀ breast cancer compared to patients with T₁N₀M₀ tumor. Serum concentration of VEGF in patients with stages T₁N₀M₀ and T₂N₀M₀ breast cancer did not depend on patient's age and reproductive function and receptor status of the primary tumor (estrogen and progesterone receptors), but was closely associated with tumor histogenesis and differentiation degree. Significantly higher levels of VEGF were observed in patients with lobular infiltrative breast carcinoma compared to patients with ductal tumors and in patients with low-differentiated tumors compared to highly and moderately differentiated tumors. High initial concentrations of VEGF (≥300 pg/ml) were more often detected in patients with T₂N₀M₀ breast cancer developing relapses within the first 3 years of follow-up compared to patients without relapses during the corresponding period (p=0.001). These findings suggest that serum level of VEGF in patients with T₂N₀M₀ breast cancer before treatment can be used as an additional marker in parallel with standard clinical and morphological signs of the disease for more precise prognosis of early relapse.

Key words: breast cancer, VEGF, prognosis.

Введение

В последние годы пристальный интерес исследователей привлекает проблема ангиогенеза и антиангиогенной терапии опухолей, в том числе РМЖ [9; 11; 12; 16]. Ряд клинических исследований указывают на существование определенной связи между высокими уровнями ангиогенных факторов в сыворотке крови больных РМЖ, увеличением плотности сосудов в опухоли и неблагоприятным прогнозом заболевания [2–4; 6]. Поэтому

экспериментальные исследования были направлены на выделение факторов ангиогенеза с надеждой использовать эти результаты для ингибирования активности процесса и, в конечном счете, роста опухоли и развития метастазов [1; 5; 10; 13]. Кроме того, антиангиогенная терапия заслуживает пристального внимания еще и потому, что, в отличие от клеток опухоли, которые генетически непостоянны и могут быстро приобретать резистентность ко многим химиопрепаратам, эндотелиальные клетки должны сохранять устойчивый геном [10].

Однако, несмотря на всю привлекательность такого подхода и определенные успехи антиангиогенной терапии в онкологической клинике, результаты, полученные к настоящему времени, свидетельствуют о том, что такое лечение эффективно не у всех больных. По мнению некоторых авторов, результаты практических исследований противоречат ряду теоретических представлений механизма действия таргетных препаратов [15]. По-видимому, это может быть связано с индивидуальными особенностями опухоли включать другие митогенные пути и механизмы в ее прогрессии – возможно, неангиогенные [14]. В таком случае возникает необходимость стратификации пациентов на основании анализа молекулярно-биологических маркеров, в том числе – и ангиогенного статуса сыворотки крови и опухоли не только в оценке прогноза, но и отбора больных для проведения так называемой целенаправленной (таргетной) терапии опухолей [2; 4; 7; 8; 13].

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ содержания ключевого активатора ангиогенеза фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий с учетом клинико-морфологических особенностей заболевания, рецепторного статуса опухоли и показателей безрецидивной выживаемости в зависимости от исходной концентрации VEGF.

Материалы и методы

В исследование включены 248 больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий, которые находились на обследовании и лечении в Московском областном онкологическом диспансере (г. Балашиха) и в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН в период с сентября 2002 по декабрь 2005 гг. Средний возраст больных составил 57,9 ± 0,7 лет (медиана – 57,5 лет). В T₁N₀M₀ стадии было 76 (31%), в T₂N₀M₀ стадии 172 (69%) больные. Средний возраст больных РМЖ в T₁N₀M₀ и T₂N₀M₀ стадиях опухолевого процесса не различался и составил соответственно 58,1±1,2 лет и 57,8±0,8 лет. В репродуктивном периоде была 71, в постменопаузе – 177 пациенток.

Клинико-рентгенологический диагноз РМЖ у всех обследованных установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования удаленной хирургическим методом первичной опухоли согласно Международной классификации опухолей (ВОЗ, 2002). Дольковый инфильтративный РМЖ выявлен у 27 (10,9%) больных, протоковый инфильтративный рак – у 106 (42,7%), смешанный – у 106 (42,7%), слизистый – у 9 (3,6%).

Группу контроля составили 55 практически здоровых женщин соответствующего возраста и репродуктивного статуса.

У большинства больных РМЖ (87,5%) была выполнена радикальная мастэктомия, радикальная резекция – в 12,5% наблюдений. В послеоперационном периоде 39 (15,7%) больных РМЖ не получали специфического лечения, 142 (57,2%) больным проведено лучевое лечение, 71 (28,6%) пациентка получила химиотерапию различными препаратами (CMF, антрациклины), 123 (49,6%) пациентки получали гормонотерапию.

Из 248 женщин, страдающих РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий у 53 (21,4%) выявлены рецидивы заболевания в сроки от 5 до 58,5 мес., средний срок развития рецидива составил 27,0 ± 2,0 мес. (медиана 26,3 мес.). У 15 больных выявлены метастазы в костях, у 6 – в легких, в плевре [1], надключичных лимфатических узлах [1], печени [2], органах малого таза [1], яични-

ках [2], контралатеральной молочной железе [5], у 14 – в нескольких органах. Рецидив в послеоперационном рубце выявлен у 6 больных, у 5 из них он сочетался с метастазами в других органах.

Концентрацию VEGF в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием реактивов «Quantikine human VEGF» («R&D Systems Inc.», США) и автоматического универсального ридера для микропланшет ELX800 («Bio-Tek Instruments, Inc., США).

Определение уровня экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в опухоли больных РМЖ

Экспрессию РЭ и РП в ткани опухоли изучали с помощью общепринятых иммуногистохимических методов исследования путем окрашивания парафиновых срезов ткани первичных опухолей больных РМЖ с использованием МКА («Dako», Дания). По интенсивности экспрессии РЭ и РП в цитоплазме и ядрах опухолевых клеток больные были разделены на группы:

1. Отсутствие экспрессии (РЭ- и РП-);
2. Наличие экспрессии (РЭ+ и РП+).

Статистический анализ изучаемых признаков проводили с помощью пакета программ «Statistica для Windows» и SPSS. Для выявления различий средних значений применяли однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ. При оценке параметрических результатов исследования и множественных сравнений между группами использовали критерий Scheffe. Для малых выборок и для типа распределения, отличного от нормального, достоверность различия средних оценивали с помощью непараметрических критериев (медианного, Колмогорова-Смирнова, Mann-Whitney). Достоверность различий частот в изучаемых признаках оценивали с помощью критерия χ^2 ; для малых выборок рассчитывался непараметрический точный критерий Фишера.

Анализ кривых выживаемости проводили методом Kaplan-Mayer, сравнения кривых выживаемости проводили методом Log-Rank, с учетом поправки Bonferroni для множественных сравнений. Рассчитывали таблицы дожития с вычислением функций рисков. Многофакторный анализ влияния признаков на безрецидивную и общую выживаемость проводили с использованием модели Cox hazard proportional regression. При выборе статистических процедур учитывали методологические требования Международного конгресса по гармонизации GCP «Статистические принципы для клинических исследований» (ICH Guidelines // Good Clin. Pract. J. – 1998. – Vol.5, N.4. – p. 27-37).

Результаты исследования

Результаты определения VEGF в сыворотке крови больных РМЖ и в группе контроля представлены в табл. 1. Анализ полученных данных выявил, что концентрация VEGF в сыворотке крови 55 практически здоровых женщин была достоверно ниже, чем в общей группе больных РМЖ. Исходные уровни VEGF в сыворотке крови практически здоровых женщин колебались от 48 до 377 пг/мл. Учитывая тот факт, что только у 3 из 55 (5,5%) женщин в группе контроля показатель VEGF в сыворотке крови превышал 300 пг/мл, его использовали как пороговый. При этом следует отметить, что только у 53 из 248 (21,4%) больных РМЖ показатель VEGF в сыворотке крови превышал пороговый его уровень у практически здоровых женщин группы контроля.

Частота выявления значений VEGF выше порогового у больных РМЖ в T₂N₀M₀ стадии была почти в 2 раза выше, чем у больных T₁N₀M₀ стадии опухолевого процесса (25,0 и 13,2% соответственно).

Уровень VEGF в сыворотке крови больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий не зависел от возраста и репродуктивного статуса.

У больных с дольковым инфильтративным РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий содержание VEGF в сыворотке крови было достоверно выше, чем у больных с протоковым инфильтративным РМЖ (p=0,002).

При этом, тенденция к этим различиям становилась уже заметной в группе больных РМЖ в T₁N₀M₀ стадии опухолевого процесса (p=0,052). Показатели VEGF в сыворотке крови больных со слизистым строением РМЖ, напротив, были достоверно ниже (p=0,03), чем при дольковом инфильтративном варианте строения опухоли (табл. 2).

Выявлена связь исходных показателей VEGF в сыворотке крови больных РМЖ со степенью дифференцировки опухоли.

Достоверно по этому показателю отличались больные с высокодифференцированным и низкодифференцированным РМЖ (табл. 3).

Частота выявления значений VEGF ≥ 300 пг/мл в сыворотке крови 47 больных высокодифференцированным РМЖ составила 4,3%, в группе из 151 больной с умеренной степенью злокачественности – 13,3%, и многократно увеличивалась в группе из 50 больных с низкодифференцированной опухолью молочной железы – 62% (различия статистически высокодостоверны, p=0,0001).

Таким образом, концентрация VEGF в сыворотке крови более половины больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий с низкодифференцированной опухолью превышала пороговый уровень маркера в группе контроля.

Не обнаружено достоверных различий в показателях VEGF у больных РМЖ с учетом рецепторного статуса опухоли (РЭ и РП).

Проведен ретроспективный анализ данных с целью выявления прогностической значимости VEGF в сыворотке крови больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий. В исследование включены 2 группы больных РМЖ:

1. Пациентки с рецидивом заболевания в первые 3 года от начала лечения (n=53);
2. Больные, которые прожили 3 года без рецидива (n=58) (табл. 4).

В общей группе пациенток с РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий с рецидивом болезни в первые 3 года наблюдения выявлены достоверно более высокие исходные уровни VEGF в сыворотке крови (335,4 \pm 24,8 пг/мл, медиана 360) по сравнению с женщинами, у которых рецидив опухоли в эти сроки не был обнаружен (163,7 \pm 9,7 пг/мл, медиана 150 пг/мл; p<0,0001).

Однако следует отметить, что только при T₂N₀M₀ стадии РМЖ исходные уровни VEGF в сыворотке крови были выше у женщин с рецидивом заболевания (361,5 \pm 29,2 пг/мл, медиана 400,0 пг/мл), чем без такового (164,9 \pm 12,7 пг/мл, медиана 150,0 пг/мл).

При стадии T₁N₀M₀ РМЖ исходные уровни VEGF в сыворотке крови больных с рецидивом и без рецидива не различались достоверно и равнялись соответственно 226,9 \pm 42,1 и 161,4 \pm 15,0 пг/мл, медианы 207,5 и 150,0 пг/мл (p=0,1).

Важно отметить, что число больных РМЖ в T₁N₀M₀ стадии со значениями VEGF в сыворотке крови выше его порогового уровня без рецидива заболевания в течение первых 3 лет наблюдения и составило 2 из 20 (10%), а в группе с рецидивом в эти сроки – 4 из 14 (28, 6%), различия недостоверны (p=0,2).

В группе больных РМЖ во T₂N₀M₀ стадии эти частоты составили: 3 из 38 (7,9%) в группе женщин без рецидива и 25 из 39 (64,1%) в группе женщин с рецидивом болезни, различия достоверны (p=0,0001).

Таким образом, прогностическая значимость порогового уровня VEGF в сыворотке крови больных РМЖ относительно раннего (в течение 3 лет наблюдения) рецидива заметна только при стадии T₂N₀M₀.

Сравнение показателей 3-летней безрецидивной выживаемости провели у больных РМЖ с учетом порогового значения VEGF в сыворотке крови и стадии заболевания.

Так, в группе больных РМЖ в T₁N₀M₀ стадии обнаружена лишь тенденция к ухудшению прогноза при исходных значениях VEGF ≥ 300 пг/мл. Для больных РМЖ в T₂N₀M₀ стадии различия в отдаленных результатах лечения были достоверно (p=0,001) связаны с пороговым показателем VEGF (табл. 4).

У больных РМЖ в T₁N₀M₀ стадии различия в безрецидивной выживаемости становятся заметными только на 3 году жизни после проведенного лечения, тогда как у больных РМЖ при стадии T₂N₀M₀ различия достоверны на всем периоде наблюдения.

Таким образом, исходное содержание VEGF в сыворотке крови ≥ 300 пг/мл у пациенток с РМЖ T₂N₀M₀ стадии заболевания достоверно связано со сниженными на 30% показателями 3-летней безрецидивной выживаемости.

Следует также отметить, что показатели 3-летней безрецидивной выживаемости в группах больных РМЖ в T₁N₀M₀ и T₂N₀M₀ стадиях при значениях VEGF <300 пг/мл в сыворотке крови практически не различались (83,6 \pm 5,8 и 84,8 \pm 4,5% соответственно).

Таким образом, у 21,4% (53 из 248) больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий исходные уровни VEGF в сыворотке крови превышали пороговый уровень (≥ 300 пг/мл) этого фактора роста в группе практически здоровых женщин.

При этом концентрация VEGF не зависела от возраста и репродуктивной функции пациенток, рецепторного (РЭ, РП) статуса первичной опухоли, но была достоверно выше у больных дольковым инфильтративным РМЖ, по сравнению с женщинами, страдающими протоковым инфильтративным раком, а также при низкодифференцированных опухолях по сравнению с высоко- и умеренно дифференцированными.

Кроме того, у женщин, страдающих РМЖ, при T₁₋₂N₀M₀ стадиях с рецидивом заболевания в первые 3 года наблюдения более часто выявляли высокие (≥ 300 пг/мл) исходные уровни VEGF в сыворотке крови по сравнению с пациентками, у которых за данный период не было выявлено рецидива (p=0,001).

Полагаем, что исходные значения показателя VEGF можно использовать в оценке прогноза раннего рецидива только в небольшой группе больных РМЖ стадий T₁₋₂N₀M₀ как дополнительный фактор наряду с общепринятыми клинико-морфологическими характеристиками болезни.

Таблица 1

Концентрации VEGF в сыворотке крови больных РМЖ и у женщин контрольной группы

Группы сравнения	Число наблюдений	Частота значений VEGF 300 пг/мл	VEGF, пг/мл М±m (медиана)	VEGF, пг/мл (интервал)
Контроль	55	3 (5,5%)	104,8±13,8 (103,0)*	45-377
РМЖ вся группа	248	53 (21,4%)	217,3±8,0 (185,0)**	3,8-620
T ₁ N ₀ M ₀ стадия	76	10 (13,2%)	193,4±11,6 (180,0)	3,8-560
T ₂ N ₀ M ₀ стадия	172	43 (25,0%)	227,8±10,3 (190,0)	28-620

*—**p=0,001; pT₁N₀M₀vsT₂N₀M₀=0,048; T₁N₀M₀ vs контроль=0,001; pT₂N₀M₀vsконтроль=0,0001.

Таблица 2

Содержание VEGF у пациенток, страдающих РМЖ, с учетом гистологического варианта строения опухоли и стадии заболевания

Гистологический вариант строения опухоли	T ₁ N ₀ M ₀ стадия		T ₂ N ₀ M ₀ стадия		Всего	
	N	VEGF, М±m (медиана)	N	VEGF, М±m (медиана)	N	VEGF, М±m (медиана)
Дольковый инфильтративный рак	8	266,3±44,8 (225,0)*	19	279,6±41,4 (240,0)*	27	275,6±31,5 (240,0)
Протоковый инфильтративный рак	34	170,6±12,4 (182,5)**	72	201,0±10,8 (182,5)**	106	191,3±8,4 (182,5)
Смешанный дольково-протоковый рак	32	208,5±54,6 (142,0)	74	248,2±38,2 (184,0)	106	238,1±29,4 (165,0)
Слизистый рак	2	152,5±37,5 (152,5)	7	175,7±24,4 (190,0)	9	170,6±20,0 (190,0)

*—**pT₁N₀M₀стадия=0,052; *—**pT₂N₀M₀стадия=0,015

Таблица 3

Содержание VEGF в сыворотке крови больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀ стадий с учетом степени злокачественности опухоли

Степень злокачественности опухоли	T ₁ N ₀ M ₀ стадия		T ₂ N ₀ M ₀ стадия		Всего:	
	N	VEGF, пг/мл М±m (медиана)	N	VEGF, пг/мл М±m (медиана)	N	VEGF, пг/мл М±m (медиана)
Высокодифференцированная	18	122,2±13,1 (112,5) ¹	29	138,4±17,3 (110,0) ³	47	132,2±11,8 (110,0)
Умеренно дифференцированная	49	195,1±11,4 (185,0)	102	200,9±17,3 (182,5)	151	199,0±7,9 (185,0)
Низкодифференцированная	9	326,7±46,5 (310,0) ²	41	358±21,8 (360,0) ⁴	50	352,4±19,6 (352,5)

¹⁻²pT₁N₀M₀стадия=0,001; ³⁻⁴T₂N₀M₀стадия<0,0001

Таблица 4

Отдаленные результаты лечения женщин, страдающих РМЖ, с учетом исходного содержания VEGF в сыворотке крови и стадии болезни

Содержание VEGF (пг/мл) в сыворотке крови	Показатели 3-летней безрецидивной выживаемости			
	Показатели	T ₁ N ₀ M ₀ стадия	T ₂ N ₀ M ₀ стадия	Общая группа
VEGF<300	Число наблюдений	66	129	195
	3-летняя безрецидивная выживаемость	83,6±5,8%*	84,8±4,5%**	86,4±3,1%
VEGF 300	Число наблюдений	10	43	53
	3-летняя безрецидивная выживаемость	57,9±2,0%*	49,6±9,4%**	55,2±8,2%
	Медиана	45,8 мес.	53,1 мес.	54,3 мес.
	Медиана	36,8 мес.	36,7 мес.	36,9 мес.

p*—=0,3; p**—=0,001

Литература

1. *Абелев Г.И., Эрайзер Т.Л.* На пути к пониманию природы рака // Биохимия. – 2008. – том 73, N 5. – с. 605-18.
2. *Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е.* Современные представления и механизмы передачи сигналов факторов роста как основа эффективной молекулярно-направленной противоопухолевой терапии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – N.1. – с. 4-9.
3. *Жуков Н.В., Тюляндин С.А.* Целевая терапия в лечении солидных опухолей: практика противоречит теории // Биохимия. – 2008. – том 73, №5. – с.751–68.
4. *Имянитов Е.Н., Хансон К.П.* Молекулярная онкология: клинические аспекты // Санкт-Петербург. – Издательский дом СПбМАПО. – 2007. – 211 с.
5. *Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С.* Роль фактора роста эндотелия сосудов при раке молочной железы // БЭБМ. – 2002. – том 133, N.6. – с. 604–12.
6. *Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С.* Биологические маркеры опухолей в клинике – достижения, проблемы, перспективы // Молекулярная медицина. – 2008. – N.3. – с. 48–55.
7. *Луценко С.В., Киселев С.М., Северин С.Е.* Опухолевый ангиогенез. В кн.: «Рак молочной железы» под ред. Н.Е. Кушлинского, С.М.Портного, К.П. Лактионова // М. – Редакционно-издательский совет при Президиуме РАМН. – 2005. – с. 110–62.
8. *Степанова Е.В., Загрекова Е.И., Ермилова В.Д. и соавт.* Молекулярно-биологические маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы I-IIА стадии // Архив патологии. – 2003. – N.3. – с. 14–7.
9. *N. Boudreau, C. Myers.* Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment // Breast Cancer Res. – 2003. – N.5. – p. 140–6.
10. *Folkman J.* Tumor angiogenesis // Adv. Cancer Res. – 1985. – Vol. 43. –p. 175–230.
11. *S. Fox, D. Generali, A. Harris.* Breast tumor angiogenesis // Breast Cancer Res. – 2007. – Vol. 9, N.6. – p. 216–27.
12. *K. Hatake, N. Tokudome, Y. Ito.* Next Generation Molecular Targeted Agents for Breast Cancer: Focus on EGFR and VEGFR Pathways // Breast Cancer. – 2007. – Vol. 14, N.2. – p. 132–49.
13. *Jaine R.* Vessels of death or life // Sci. Amer. – 2001. – Vol. 285. – p. 39–45.
14. *Sledge G., Miller K.* Angiogenesis and antiangiogenic therapy // Curr. Probl. Cancer. – 2002. – Vol. 26. – p. 1-60.
15. *Weidner N., Folkman J., Pozza F. et al.* Tumor angiogenesis a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast cancer // J. Natl. Cancer Inst. – 1992. – Vol. 84. – p. 1875–87.
16. *F. Zagouri, Th. Sergentanis, G. Zografos.* Precursors and preinvasive lesions of the breast: the role of molecular prognostic markers in the diagnostic and therapeutic dilemma // World Journal of Surgical Oncology. –2007. – Vol. 5. – p. 57–68.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

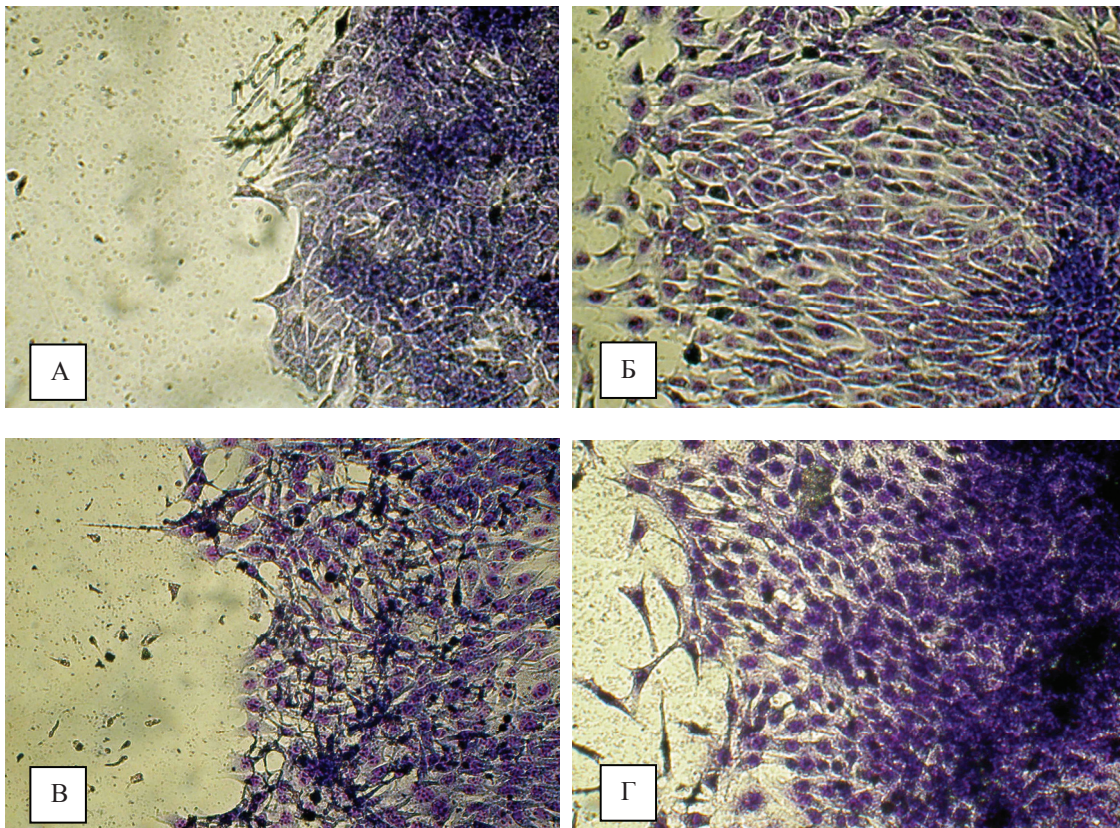


Рис. 4. Микрофотографии миграционной активности эндотелиальных клеток SVEC-4-10, полученных при инкубации с различными дозами препарата Абисилин®:

А – отрицательный контроль; Б – положительный контроль;
В – Абисилин® 0,25 мг/мл; Г – Абисилин® 0,0625 мг/мл.

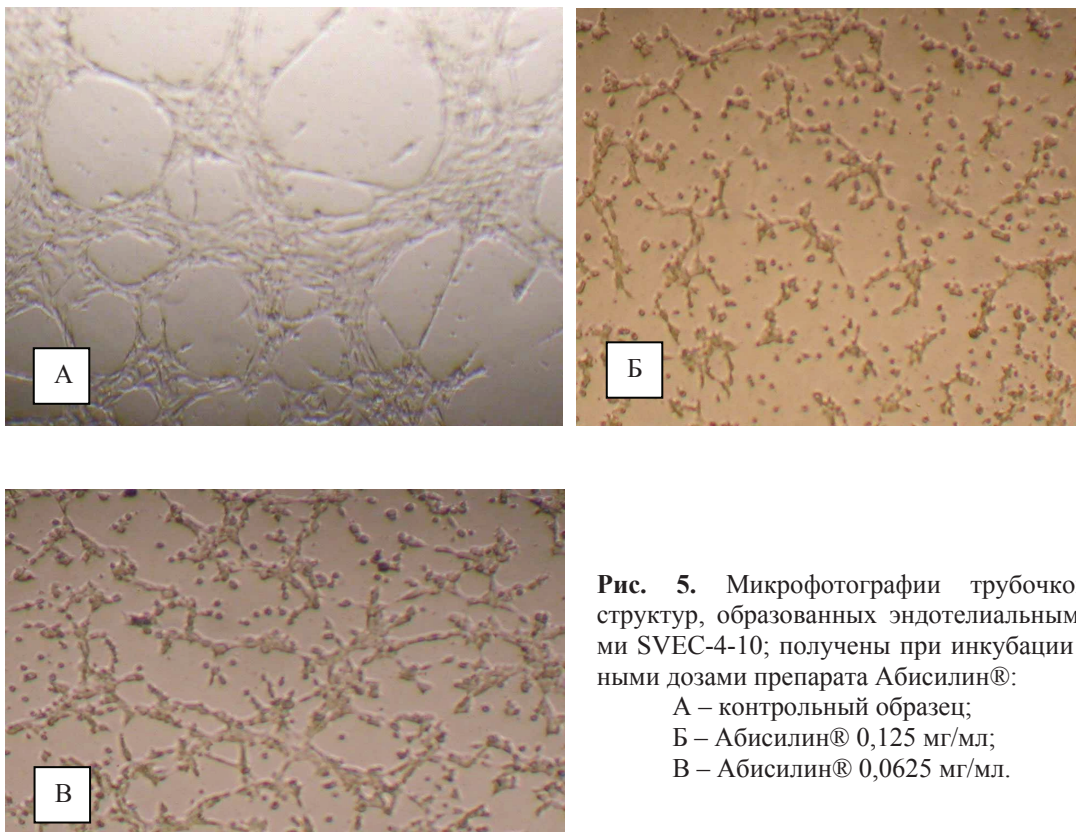
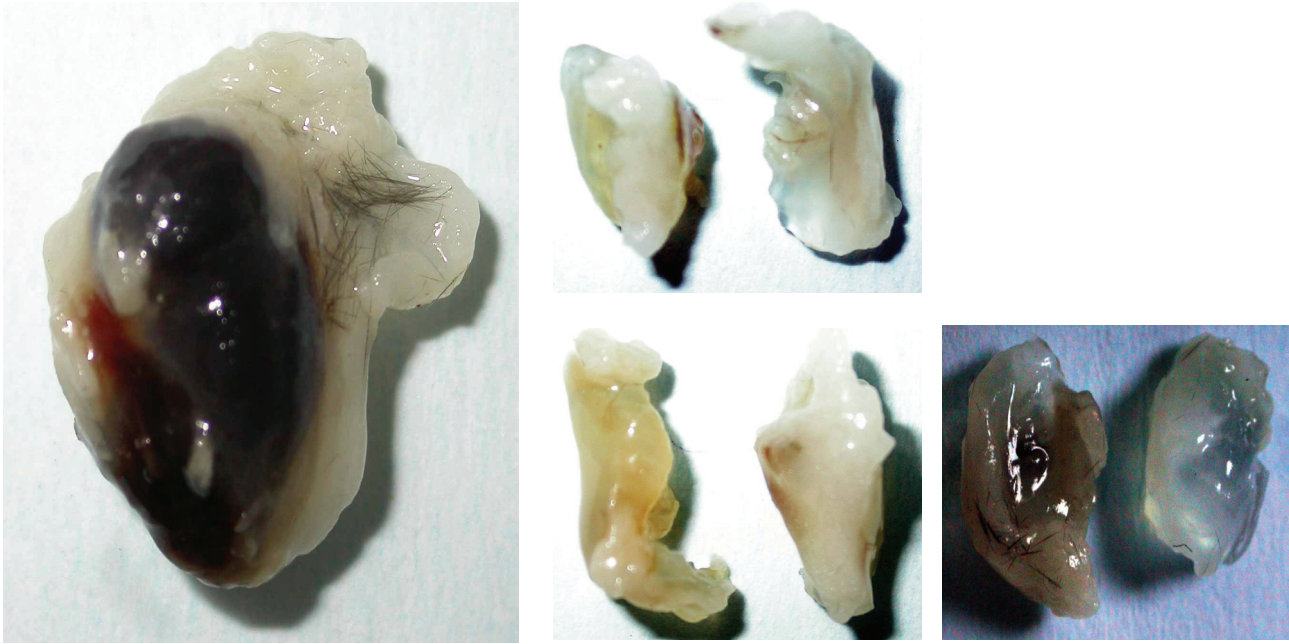


Рис. 5. Микрофотографии трубчоподобных структур, образованных эндотелиальными клетками SVEC-4-10; получены при инкубации с различными дозами препарата Абисилин®:

А – контрольный образец;
Б – Абисилин® 0,125 мг/мл;
В – Абисилин® 0,0625 мг/мл.



Положительный контроль

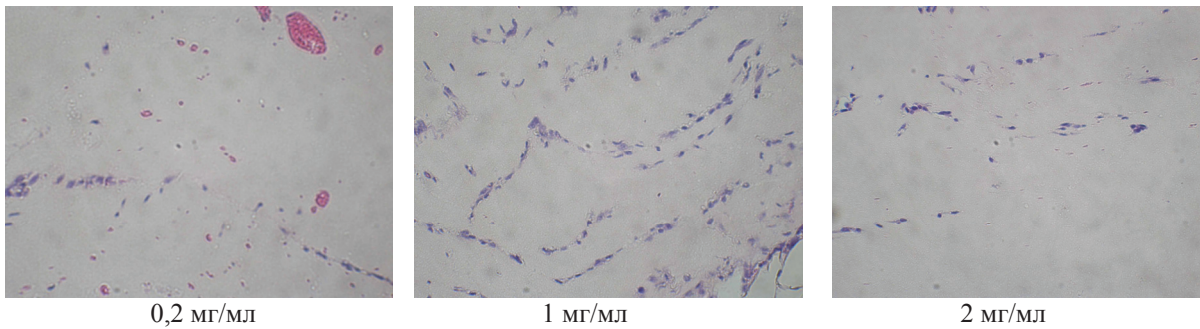


Рис. 6. Микрофотографии имплантатов Матригеля, выделенных из подкожной клетчатки мышей, и гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином; получены *in vivo* введения Абисилина® *per os*.

Рисунки к статье Д.В. Соколовой и соавт.

«ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КСЕНОГРАФТОВ ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА ЛБР-2 КАК МИШЕНИ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ»

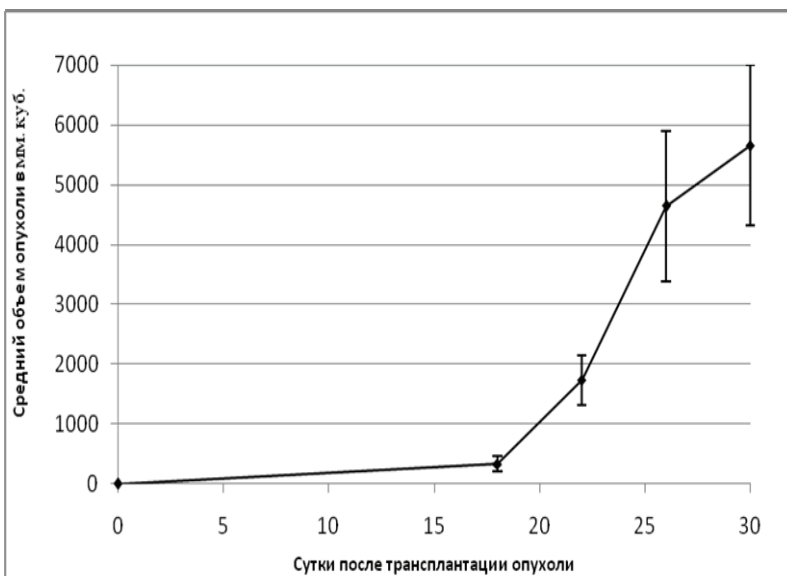


Рис. 1. Динамика роста 1-го пассажа п/к ксенографта ЛБР-2 у мышеч-самок Balb/c nude после имплантации адаптированной культуры клеток.



Рис. 2. Мышь линии Balb/c nude с п/к ксенографтом ЛБР-2 (1-й пассаж, 24-е сутки после трансплантации).

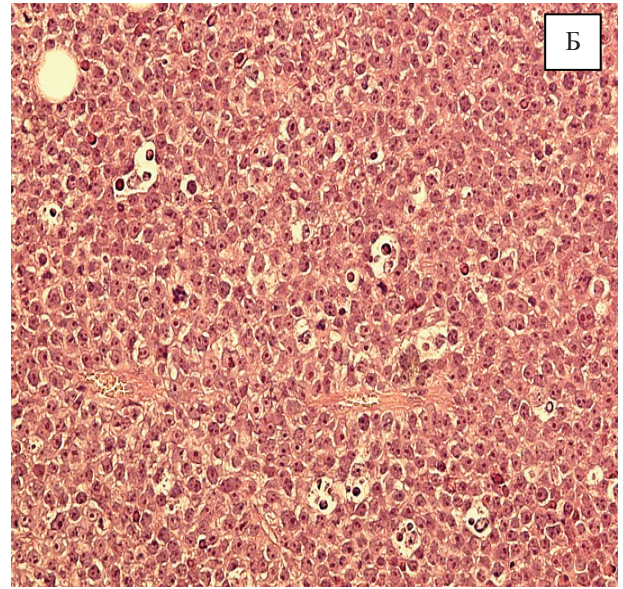
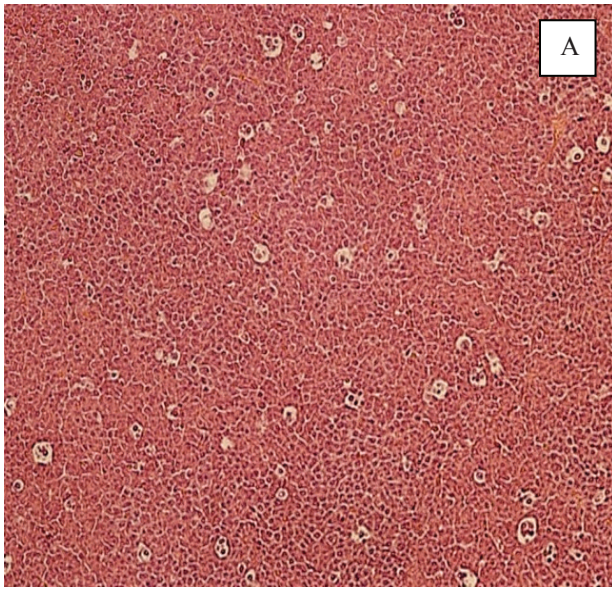


Рис. 3. П/к ксенографт ЛБР-2, 5-й пассаж, 25-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$ (А), $\times 40$ (Б).

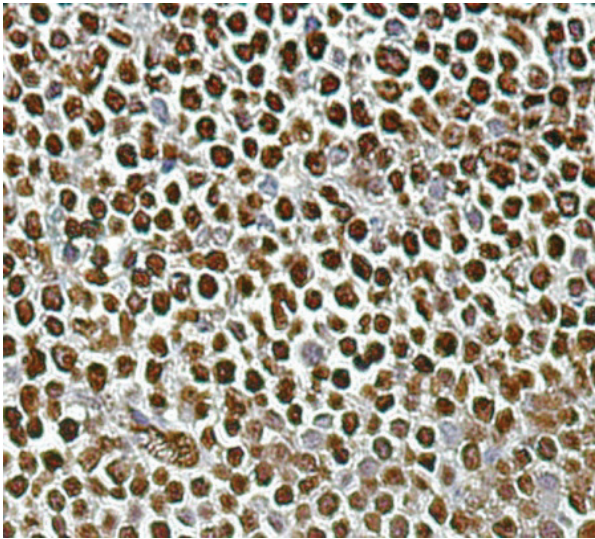


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание срезов п/к ксенографтов ЛБР-2 антителами к Ki-67 $\times 40$.

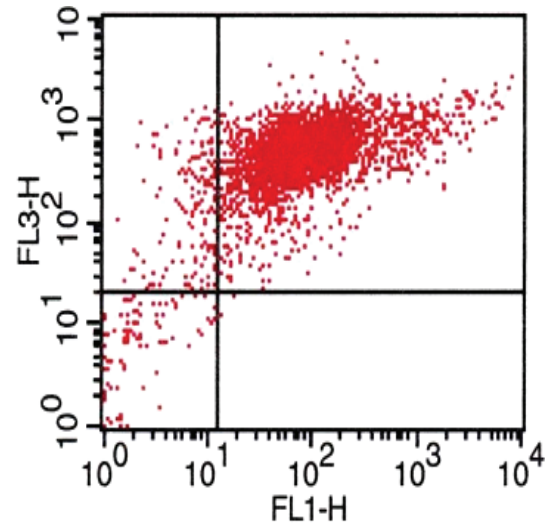


Рис. 6. Выявление совместной экспрессии CD45 и HLA-ABC на клетках ксенографтов ЛБР-2 у мышей Balb/c nude (5-й пассаж).

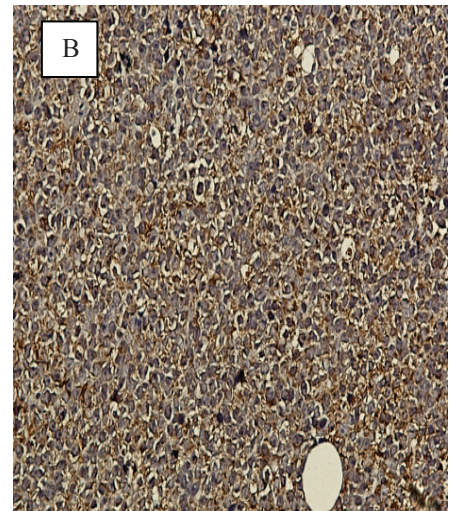
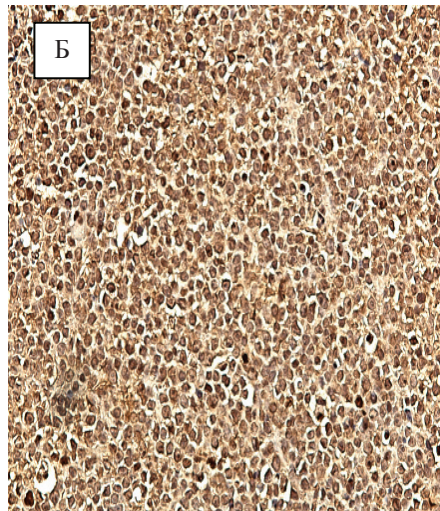
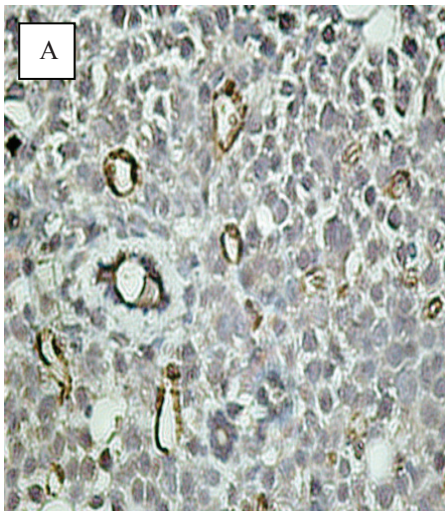


Рис. 10. Иммуногистохимическое окрашивание срезов п/к ксенографтов ЛБР-2 антителами на CD31 $\times 40$ (А), HIF-1 α $\times 40$ (Б), VEGF $\times 40$ (В)

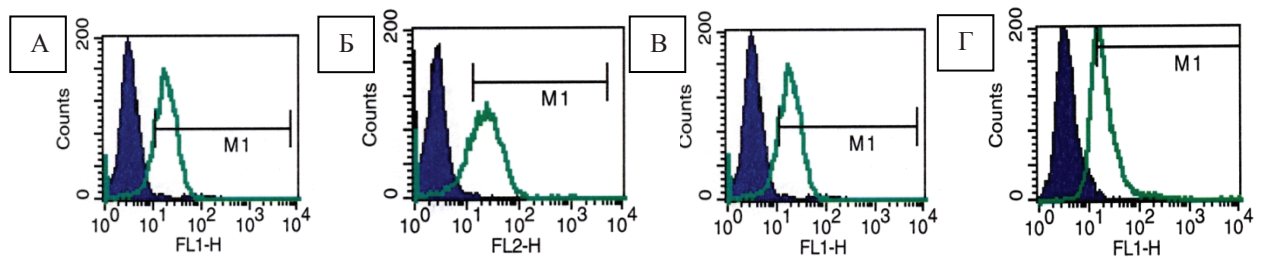


Рис. 5. Иммунофенотипирование клеток линии Namalwa: А – HLA-ABC; Б – CD19; В – CD20; Г – HLA-DR.

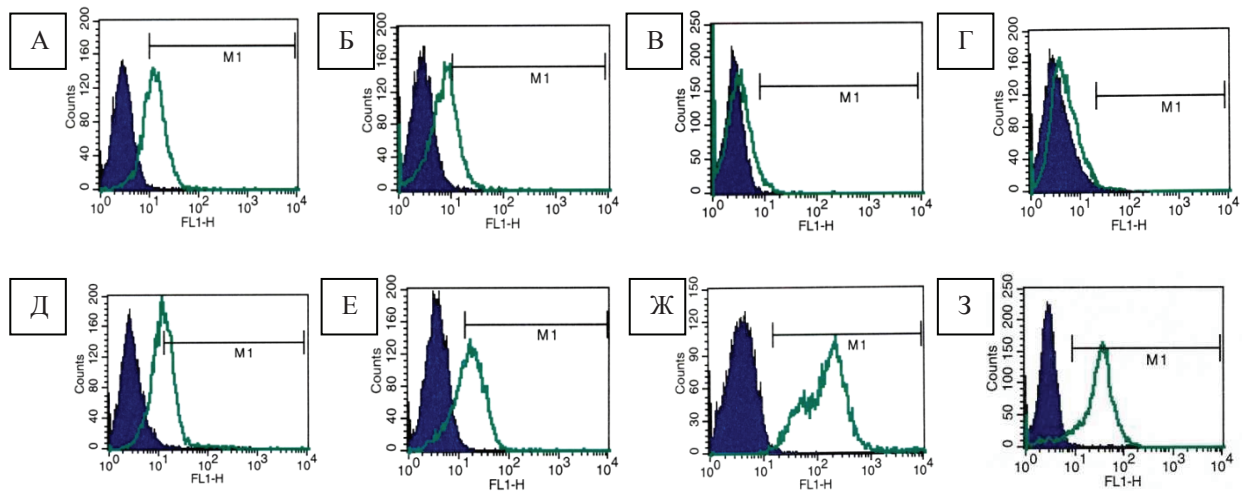


Рис. 7. Гистограммы экспрессии CD19 антигена на клетках п/к ксенографтов ЛБР-2 у мышей Balb/c nude: 1–8-й пассажи (А–З соответственно).

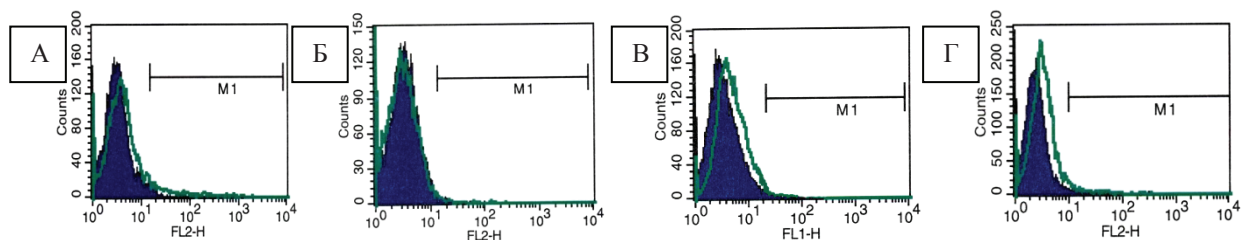


Рис. 8. Гистограммы экспрессии CD20-антигена на клетках п/к ксенографтов ЛБР-2 у мышей Balb/c nude: 1–4-й пассажи (А–Г соответственно).

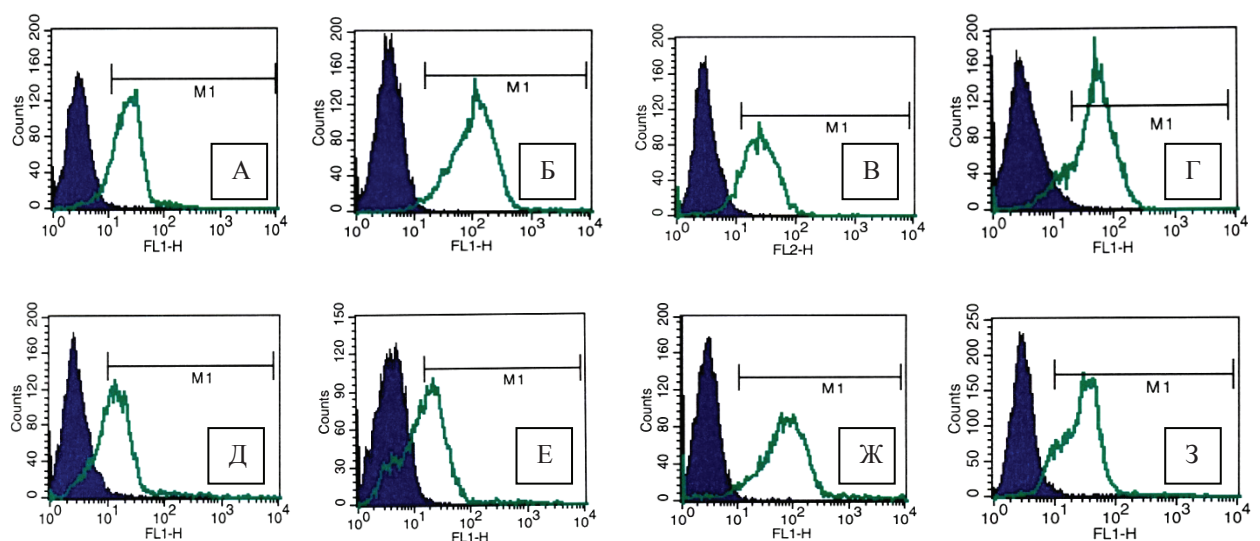


Рис. 9. Гистограммы экспрессии HLA-DR на клетках п/к ксенографтов ЛБР-2 у мышей Balb/c nude: 1–8-й пассажи (А–З соответственно).

На рис. 5; 7–9. по оси абсцисс – количество клеток; по оси ординат – интенсивность флюоресценции; закрашенные гистограммы – изотипические контроли; прозрачные гистограммы с черной линией – исследуемые антигены;

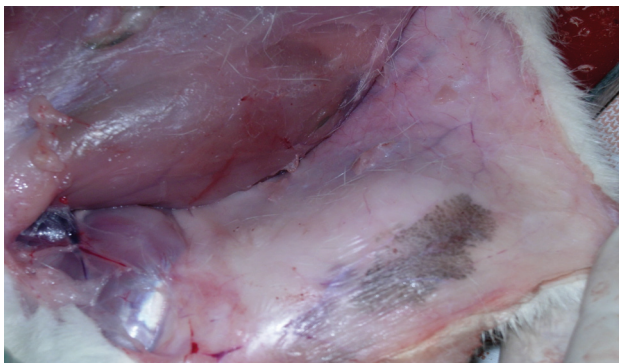


Рис. 1. Очаговая гиперпигментация (меланоз) в подкожной клетчатке крыс в местах внутрикожного введения вакцины.



Рис. 3. Опухолевые узлы, развившиеся у мышей *Balb/c nude* на 14 день после инокуляции неинaktivированных опухолевых клеток линии Mel Kog.

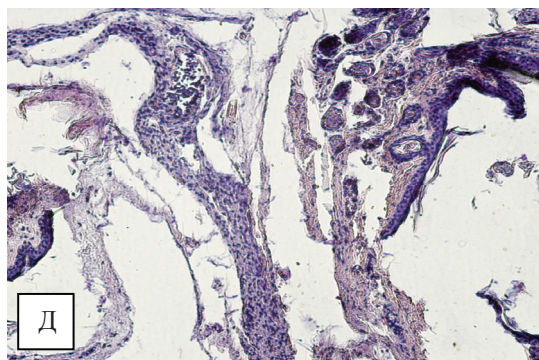
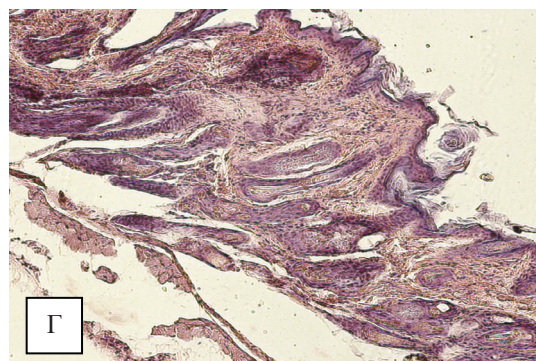
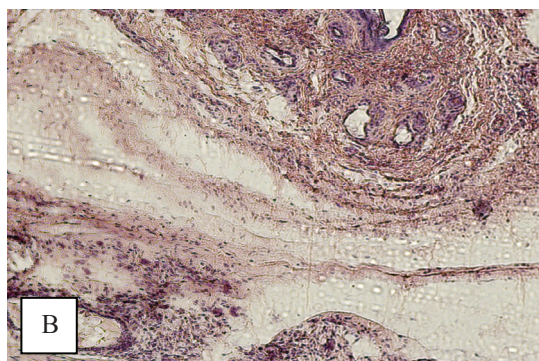
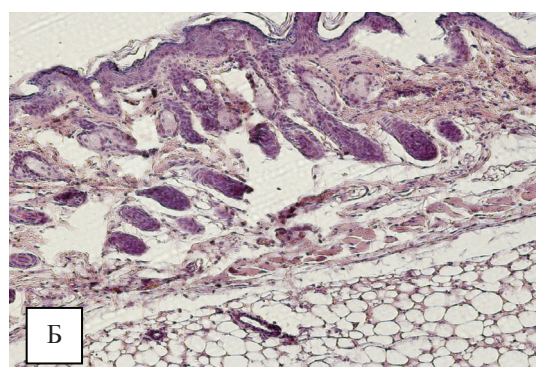
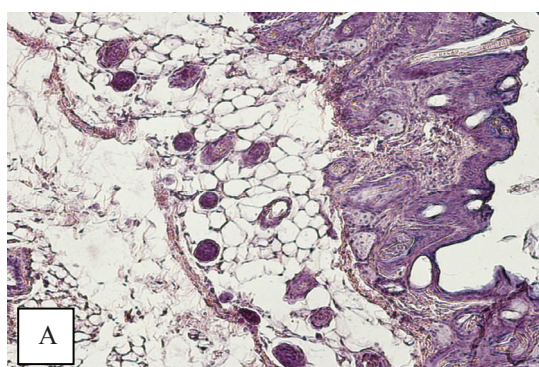


Рис. 2. Участки кожи мышей *Balb/c nude* после введения вакцины «Мелавак». Микрофото иллюстрируют отсутствие опухолей:

- А – мононуклеарная (макрофагальная) инфильтрация в сосочковом слое дермы;
- Б – повышенная макрофагальная реакция в фиброзном тяже (в фасции);
- В – соединительно-тканная клеточная реакция сосочкового слоя дермы и вокруг сосудов в подкожной клетчатке;
- Г – участок утолщения кожи;
- Д, Е – очажок детрита и макрофагов замурован в фиброзном тяже (в фасции);

Окраска гематоксилином и эозином. А, Б, В, Г, Д — (×100); Е — (×400).

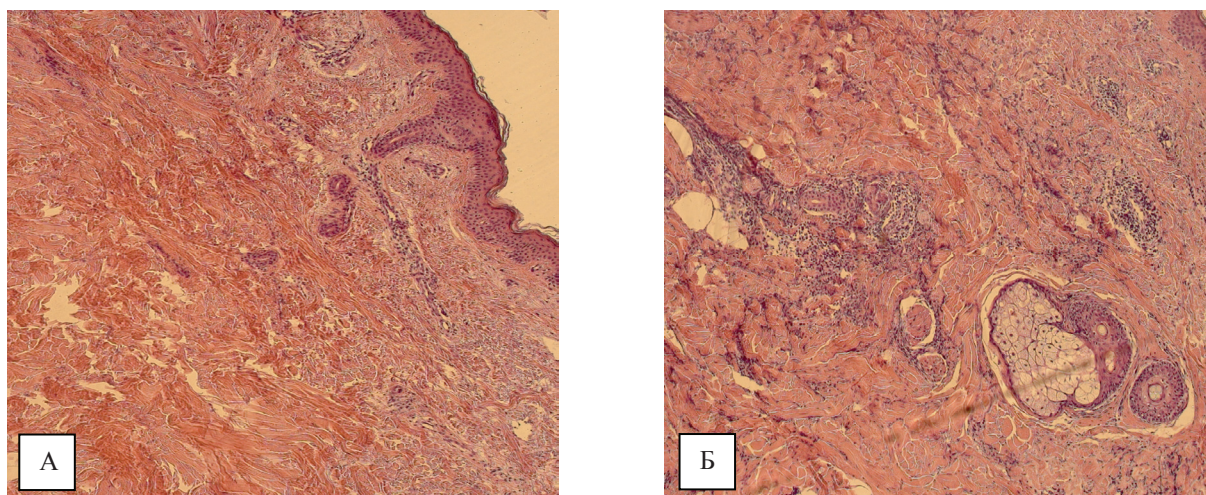


Рис. 1. Инфильтрация периваскулярных пространств сетчатого слоя, выводных протоков потовых желез, концевых отделов сальных желез на фоне вакцинации генно-инженерной вакциной:

А – до проведения вакцинотерапии;

Б – после проведения вакцинотерапии.

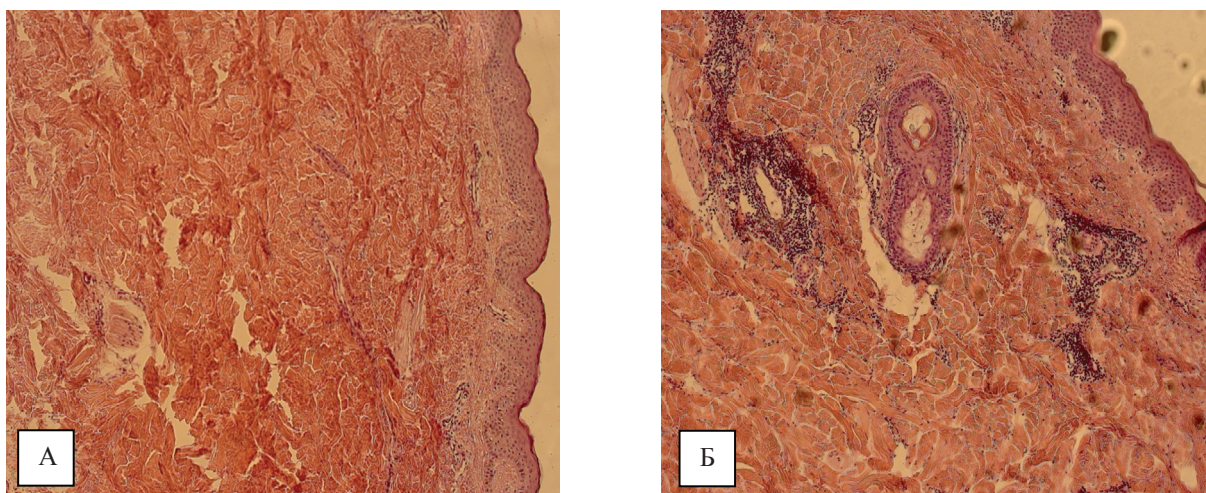


Рис. 2. Инфильтрация периваскулярных пространств сосочкового и сетчатого слоев кожи на фоне вакцинации генно-инженерной вакциной:

А – до проведения вакцинотерапии

Б – после проведения вакцинотерапии.

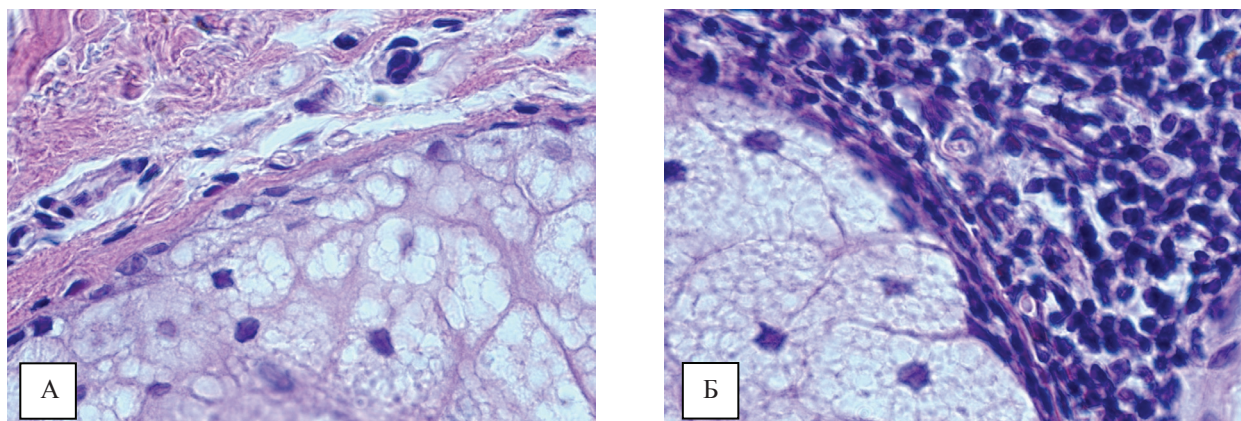


Рис. 3. Инфильтрация перигландулярных пространств сальных желез (большое увеличение) на фоне вакцинации генно-инженерной вакциной:

А – до проведения вакцинотерапии;

Б – после проведения вакцинотерапии.

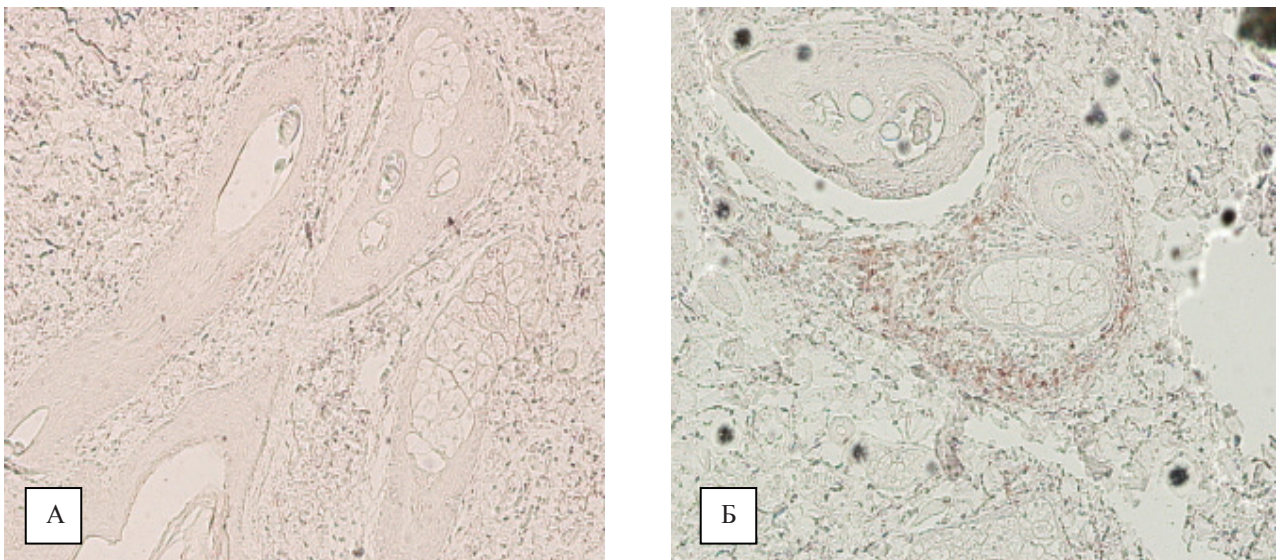


Рис. 4. Иммуногистохимическая окраска на CD8 на фоне вакцинации генно-инженерной вакциной:
 А – до проведения вакцинотерапии;
 Б – после проведения вакцинотерапии.

Рисунки к статье *М.А. Чекаловой и соавт.*

**«ВОЗМОЖНОСТИ ЭХОГРАФИИ
 ПРИ ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАЗОВ ЛЕЙОМИОСАРКОМ ТЕЛА МАТКИ»**

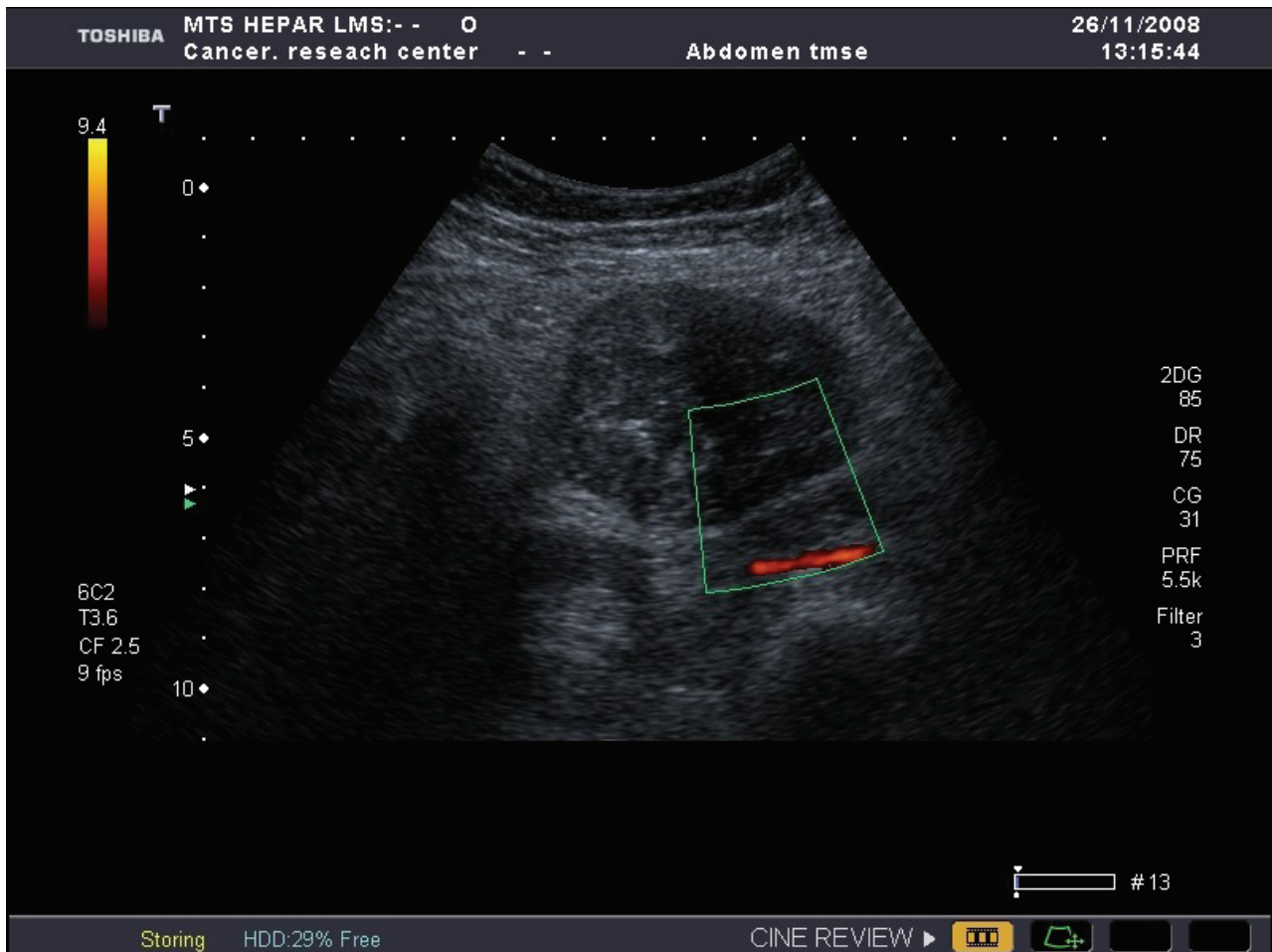


Рис. 6. Ультразвуковая томограмма больной ЛМС с метастазами в большом сальнике.



К 90-летию со дня рождения С.П. Ярмоненко

18 марта этого года исполнилось 90 лет Главному научному сотруднику РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Лауреату Государственной премии СССР, доктору биологических наук, профессору Самуилу Петровичу Ярмоненко. Из них более 40 лет он отдал развитию радиационной онкологии в нашей стране.

С.П. Ярмоненко окончил Куйбышевскую Военно-медицинскую академию за день до начала Великой Отечественной войны и сразу был направлен в действующую армию. Участвовал в обороне Донбасса, Кавказа, в Керченском десанте и освобождении Крыма, в боях на западной Украине, в Польше, Венгрии и Чехии, в боях за Прагу. Войну закончил в звании подполковника, начальника Головного полевого эвакуационного пункта. Награжден орденами Отечественной войны I и II степени, тремя орденами Красной звезды и 19 медалями.

С 1945 по 1952 г. работал в медицинском отделе Военного института иностранных языков в Москве, затем на кафедре патологии и терапии радиационных поражений Военного факультета при ЦИУ врачей. В последующем занимался вопросами противолучевой защиты в НИИ военной медицины и в Институте гигиены труда и профзаболеваний.

В 1967 г. Самуил Петрович приглашен в Институт экспериментальной и клинической онкологии АМН, где занимался изучением биологического действия протонного излучения и усовершенствованием лучевой терапии злокачественных опухолей. Под его руководством разработаны методы избирательного усиления лучевого поражения опухолей с помощью гипертермического воздействия и защиты нормальных тканей с помощью перевода больных на дыхание обедненными кислородом газовыми смесями на время сеанса облучения.

В последние годы профессор С.П. Ярмоненко большое внимание уделяет вопросам радиационной безопасности в связи с преодолением последствий аварии на Чернобыльской атомной станции и развитием атомной энергетики.

С.П. Ярмоненко – автор 250 статей и семи монографий. Подготовленный им учебник «Радиобиология человека и животных» четвертым изданием вышел в 2004 г., одно из предыдущих удостоено Государственной премии СССР и переведено на английский язык. Фундаментальные вопросы радиобиологии и лучевой терапии опухолей отражены в пяти научно-популярных книгах, также переведенных за рубежом, например, в Японии. С.П. Ярмоненко является заместителем главного редактора журнала «Медицинская радиология и радиационная безопасность». В 2008 г. вышла книга мемуаров Самуила Петровича «Преодоление», в которой он описывает пережитые им и его поколением этапы жизни, труда и научной деятельности, где соседствует радость, героизм и трагедия, которые в полной мере отразились и в истории отечественной радиационной медицины и радиоонкологии.

Поздравляя Самуила Петровича Ярмоненко с юбилеем, желаем ему здоровья и возможности и дальше трудиться на благо нашей страны.

*Коллектив Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН
Редакция «Российского биотерапевтического журнала»
Друзья и коллеги*

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БКС – бинарная каталитическая система
ВЧД – внутричерепное давление
в/б – внутрибрюшинно
в/в – внутривенно
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома
 бГК – быстрорастущая дедифференцированная гепатоцеллюлярная карцинома
 мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная карцинома
ГПВ/GPV – гликопептидная противоопухолевая вакцина /glycopeptide cancer vaccine
ДМБА – диметил- α -бензантрацена
ЗНО – злокачественные новообразования
ЛТ – лучевая терапия
МЛ – моноклеарные 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
НХЛ – неходжкинская лимфома
ОБО – объективный ответ
ОО – отсутствие ответа
ОЦК – объем циркулирующей крови
РМЖ – рак молочной железы
 МР РМЖ – местнораспространенный рак молочной железы
 ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма рака молочной железы
РЭС – ретикулоэндотелиальная система
ПВП – поливинилпирролидон
ПД – пролиферация и дифференцировка
ПЗ – прогрессирование заболевания
ПО – полный ответ
ПОПР – полиоксипропилен
ПФОС – перфторорганические соединения
ПХТ – полихимиотерапия
ПЯ – палочкоядерный
КРР – колоректальный рак
РКТ – рентгеновская компьютерная томография
РЛ – рак легкого
РМЖ – рак молочной железы
РПЖ – рак поджелудочной железы
РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов
РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками
СЗП – свежемороженая плазма
СПЖ – средняя продолжительность жизни
СЯ – сегментоядерный
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография
ФД – флуоресцентная диагностика
ФС – фотосенс
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ФТС – фетальная телячья сыворотка
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз
ХТ – химиотерапия
ЦФ – циклофосфан
ЧО – частичный ответ
ЭФР – эпидермальный фактор роста
EPR effect – enhanced permeability and retention effect (эффект повышения проницаемости и удерживания)
LLC – lung carcinoma Lewis (Mw – molecular weight (молекулярный вес)
HER – human epidermal growth factor receptor
TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor