



ISSN 1726-9784

# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

**Материалы III Всероссийской научной конференции  
с международным участием «Наноонкология».  
Саратов, 6–7 сентября 2011 г.**

**Russian Journal  
of Biotherapy**

**4/2011**

ISSN 1726-9784

# РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№4 Том 10 2011 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. (Нижегород),  
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, академик 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](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
Интернет-версия: [www.ronc.ru/1915](http://www.ronc.ru/1915)

## Подписной индекс 81679

Объем 7,5 усл.-печ. листов,  
подписано в печать 24.11.2011  
Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:  
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.  
Тел. +7 (495) 324 24 70; [ronc@list.ru](mailto: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](mailto:info@ognimsk.ru), [www.ognimsk.ru](http://www.ognimsk.ru)

# СОДЕРЖАНИЕ

*К.А. Скрыпник, В.С. Косоруков*

## РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ

ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....3

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*А.А. Коломейцева, Е.В. Степанова, И.М. Газарин, Е.Г. Родникова, Д.С. Рзаев, В.А. Горбунова, А.Ю. Барышников*  
**ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ  
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА  
У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**.....9

*Н.В. Голубцова, И.Н. Михайлова, К.А. Парсункова, Н.А. Балацкая, К.А. Барышников, И.В. Евсегнеева, М.В. Огородникова,  
И.В. Манина, И.Н. Григорьева, Е.В. Коржневская, Г.З. Чкадуа, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин*  
**ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2  
У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ  
В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ**.....13

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

*А.М. Дейчман*

**О ВОЗМОЖНЫХ НОВЫХ МЕХАНИЗМАХ  
ОБРАЗОВАНИЯ КОРОТКИХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ,  
УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОМА**.....17

*Н.Г. Кормош*

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ  
АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА  
(СУБКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ) – ВЗГЛЯД КЛИНИЦИСТА**.....29

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Н.Н. Семенов, Е.В. Степанова, М.Р. Личиницер*  
**ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИНТЕГРИНОВ  $\alpha_V\beta_3$  И  $\alpha_V\beta_5$ ,  
ПАРАТИРЕОИД-ПОДОБНОГО ГОРМОНА, РЕЦЕПТОРОВ К ПТНП  
ОСТЕОПОНТИНА В РАЗВИТИИ МЕТАСТАЗОВ В КОСТИ  
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПОЧКИ**.....37

*А.Н. Балаев, В.Н. Осипов, К.А. Охманович, В.Е. Федеоров, Е.В. Решетников*  
**ПОЛУЧЕНИЕ Н-РНЕ-D-TRP-LYS( $\epsilon$ -ВОС)-THROME  
– ТЕТРАПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА СИНТЕЗА АНАЛОГОВ СОМАТОСТАТИНА**.....43

*Ю.В. Дутикова, В.А. Ольшевская, А.А. Штиль, Д.Н. Калюжный*  
**НЕ ТОЛЬКО ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ:  
ПОРФИРИНЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ДНК-ЛИГАНДЫ**.....47

*З.С. Смирнова, Е.В. Санарова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, Н.А. Оборотова, О.Л. Орлова,  
А.П. Полозкова, Г.А. Меерович, Е.А. Лукьянец*  
**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ  
С ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМОЙ ТИОСЕНСА  
НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ**.....55

*Т.В. Михайлова, М.А. Барышникова, О.В. Клименко, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин*  
**РАЗРАБОТКА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ**.....61

*Н.А. Оськина, У.А. Боярских, А.Ф. Лазарев, В.Д. Петрова, Д.И. Ганов, О.Г. Тоначева,  
Г.И. Лифшиц, М.Л. Филиппенко*  
**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ЗАМЕН  
В ГЕНЕ РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D  
НА РИСК РАЗВИТИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
В ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ РФ**.....67

*Д.В. Филоненко, М.Б. Бычков, В.А. Горбунова, Е.М. Трещалина*  
**РЕЗУЛЬТАТЫ I ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ  
БИНАРНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ТЕРАФТАЛ + АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА  
У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЕВЫМИ ПЛЕВРИТАМИ**.....71

*Л.Б. Хворостенко, М.Н. Делиханова, В.А. Платицын, О.И. Фролова*  
**ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ  
И ЭРИТРОЦИТОВ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ**.....75

*Д.Ю. Блохин, Г.Ф. Чмутин, П.К. Иванов*  
**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ:  
ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДУЛЯТОРЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ, Ч. II)**...81

## Материалы III Всероссийской научной конференции

с международным участием «Наноонкология». Саратов, 6–7 сентября 2011 г. ....89

Содержание «Российского биотерапевтического журнала» за 2011 год.....42; 46; 54; 60

Правила оформления статей.....8; 28; 36

Список сокращений.....114

К 80-летию со дня рождения М.А. Красновой.....117

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 576.385.5

*К.А. Скрыпник, В.С. Косоруков***РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ****ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА***РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Скрыпник Ксения Александровна, научный сотрудник лаборатории трансгенных препаратов НИИ ЭДyТО***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-14-59**e-mail:** [kssa@yandex.ru](mailto:kssa@yandex.ru)

Статья поступила: 06.07.2011, принята к печати 20.10.2011

**Резюме**

Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор можно назвать одним из основных цитокинов, применяемых в химиотерапевтической онкологической практике. Он активно стимулирует рост числа нейтрофилов, что положительно сказывается на лечении различных нейтропенических состояний, влияя на их пролиферацию, созревание и дифференцировку. Создание рекомбинантных аналогов природного человеческого Г-КСФ является одной из важных биотехнологических задач. При разработке таких аналогов важно подобрать подходящую экспрессионную систему, позволяющую получать достаточные количества препарата и использовать систему очистки, обеспечивающую сохранение биологической активности целевого белка. В обзоре рассмотрены современные стратегии, применяемые при экспрессии рекомбинантного чГ-КСФ, отмечены плюсы и минусы используемых подходов.

**Ключевые слова:** Г-КСФ, экспрессия, рекомбинантные продуценты.*K.A. Skrypnik, V.S. Kosorukov***RECOMBINANT PROTEINS****OF GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) is one of the main hematopoietic factors used during chemotherapy in oncology. It has various functions: neutrophil maturation and differentiation, stem cell mobilisation and others. One of the main purposes of the modern biotechnology is the development of therapeutic recombinant protein analogs, particularly hG-CSF analog. It's important not only to select the expression system that allows to get high protein level but also to choose the proper purification system. This review describes the modern approaches used for recombinant hG-CSF analogs development. Their pros and cons are observed below.

**Key words:** G-CSF, expression, recombinant proteins.**Введение**

Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (чГ-КСФ) является одним из ключевых цитокинов, применяемых в онкологии. Он стимулирует развитие нейтрофилов, оказывая влияние на их пролиферацию, созревание и дифференцировку. Препараты чГ-КСФ используются для лечения нейтропении – состояния, характеризующего снижением числа нейтрофилов. Подобное нарушение может быть как врожденным, так и приобретенным в результате инфекционных и аутоиммунных заболеваний, а также, как правило, является следствием проведения химио- или радиотерапии.

Организм пациента, страдающего нейтропенией, не способен эффективно сопротивляться инфекциям, иммунитет такого больного снижен. Введение препаратов, созданных на основе рекомбинантных форм чГ-КСФ, позволяет увеличить количество нейтрофилов, повысить иммунитет и избежать возникновения сопряженных инфекций. На-

пример, использование в протоколе химиотерапии этапов с лечением чГ-КСФ значительно улучшает переносимость процедуры и позволяет использовать более агрессивные последовательности химиотерапевтических обработок, что, в свою очередь, положительно отражается на эффективности лечения и выживаемости пациентов.

Впервые колониестимулирующие факторы были описаны в 1960-х гг. Исследователями была изучена группа белков, которая оказывала влияние на развитие незрелых гемопоэтических клеток. Очистка каждого из белков с последующим клонированием сделало возможным определение биологической функции каждого из компонентов, в том числе и Г-КСФ [9; 22].

Ген, кодирующий белок чГ-КСФ, расположен на 17 хромосоме. Экспрессируется Г-КСФ главным образом моноцитами и макрофагами, а также астроцитами, эндотелиальными клетками, фибробластами. Результатом экспрессии чГ-КСФ является гликопротеид, состоящий из 174 аминокислот.

Осуществление биологических функций чГ-КСФ возможно после его связывания с рецептором. Рецептор чГ-КСФ (чГ-КСФ-Р) – мембранный белок, экспрессирующийся на поверхности практически всех клеток миелоидного ряда – как миелобластов, так и дифференцированных нейтрофилов [2]. Связывание чГ-КСФ с рецептором приводит к запуску ряда сигнальных путей – Jak-STAT, Ras-MAP, PI-3. Активация сигнальных каскадов увеличивает число нейтрофилов в периферической крови, стимулируя пролиферацию их предшественников.

Уже более 20 лет чГ-КСФ применяется в гематологической и онкологической практике для лечения или облегчения состояния пациентов с различными нарушениями. Исследование биологических активностей этого цитокина продолжается и сегодня. В последние годы было проведено множество работ, показывающих, что чГ-КСФ может быть использован не только при лечении онкологических заболеваний. Этот цитокин исключительно перспективен для лечения ряда аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний, последствий инфаркта миокарда и инсульта [18; 26].

Следует заметить, что лечение препаратами на основе Г-КСФ используется не только в клинической практике, но и в ветеринарии. Были клонированы и экспрессированы гены не только человеческого Г-КСФ, но и Г-КСФ других организмов. В настоящее время существует рекомбинантный аналог кошачьего Г-КСФ [29], применяющийся для лечения кошек, страдающих от нейтропенического состояния. Экспрессия и очистка собачьего Г-КСФ сделали возможным отказаться при лечении нейтропении от использования чГ-КСФ, обладавшего иммуногенным эффектом [23; 30]. Разработан бычий Г-КСФ, применяемый для лечения нейтропенических постхимиотерапевтических состояний крупного рогатого скота и лошадей [22].

В настоящее время создан ряд модифицированных рекомбинантных аналогов чГ-КСФ, которые используются в клинической практике и ветеринарии [8] и их свойства достаточно подробно исследованы. Несмотря на большой объем исследовательской информации по рекомбинантным формам чГ-КСФ, и скорее всего благодаря этому, продолжают активные разработки в области перспективных технологий экспрессии и очистки этого фармакологического белка, исследуются новые оригинальные подходы к созданию новых продуцирующих систем.

#### **Пути экспрессии Г-КСФ.**

##### **Эукариотические продуценты**

Наибольшее внимание уделяется получению и использованию человеческого рекомбинантного Г-КСФ. Для его экспрессии используются различные продуцирующие системы. Естественным выбором для получения полностью функционального рекомбинантного белка человека являются системы на основе эукариотических культур клеток. Использование для продуцирования белка клеточных линий имеет как преимущества, так и недостатки. На современном этапе развития данная экспрессионная система позволяет достигать достаточно высокого уровня экспрессии целевого белка в процессе ферментации. С другой стороны, получение одновременно хорошо растущей и эффективно экспрессирующей линии является сложной задачей. Кроме того, как правило, такие линии достаточно нестабильны и требуют постоянных усилий в поддержании их технологических характеристик, а зачастую и повторных работ по созданию линий [12].

Важно, что при экспрессии в культурах клеток млекопитающих обеспечивается правильное сворачивание белка и гликозилирование, это делает получаемый

рекомбинантный аналог идентичным нативному белку. При использовании такой экспрессионной системы получают коммерческий аналог ленограстим – гликозилированную форму чГ-КСФ, которая выпускается под названием Граноцит™ фирмой Sanofi-Aventis (Франция).

Другими эукариотическими продуцентами, используемыми в биотехнологии, являются дрожжи. В дрожжах может осуществляться необходимый процессинг предшественника целевого белка с последующей секрецией продукта в культуральную среду. Выбор дрожжей в качестве продуцента позволяет упростить процесс очистки целевого белка, а уровень экспрессии достигает 20–200 мг/л. Несмотря на явные преимущества использования дрожжей в качестве продуцента, следует отметить несовершенство гликозилирования, которое отличается от гликозилирования в организме человека. При получении рекомбинантного чГ-КСФ в дрожжах секретируемый белок образовывал обширные мультимерные комплексы. Такая агрегация влияет на способность белка связываться с рецептором, т.е. приводит к значительному уменьшению биологической активности [3; 4]. Белковые комплексы могут быть обработаны мочевиной или гуанидин хлоридом, денатурирующими белок. Последующий рефолдинг позволяет ренатурировать белок и восстановить его биологическую активность [16]. В последние годы были проведены эксперименты, в ходе которых удалось значительно уменьшить уровень агрегации, но не исключить ее вообще [5].

##### **Трансгенные организмы**

Еще одним путем экспрессии рекомбинантных белков является использование генетически измененных животных. В качестве животных-биореакторов используются мыши, коровы, свиньи, кролики и др. Существует несколько возможных подходов к созданию трансгенных животных, экспрессирующих лекарственные белки. Как правило, используют микроинъекцию генетических конструкций в ооциты [7] или трансфекцию спермы [6, 17].

Недостатками этого пути являются сложность, длительность и низкая эффективность получения трансгенных животных. Преимущества использования животных-биореакторов:

- легко воспроизводимо естественным путем,
- передача потомству способности воспроизводить целевой продукт.

Целевой белок подвергается посттрансляционным модификациям, чего не происходит при использовании микроорганизмов. Использование трансгенных животных позволяет получать достаточно большие количества целевого белка (до 1г/л), соответственно единицы или десятки трансгенных животных способны обеспечить фармацевтический рынок необходимым белком.

Выбор животного определяется его продуктивностью, сроками получения целевого белка, необходимым количеством нужного препарата.

Наиболее часто используемым путем экспрессии является экспрессия целевого белка в молоко трансгенных животных. Впервые таким образом из молока трансгенных мышей был получен козий β-лактоглобулин [25]. В настоящее время получен ряд терапевтических белков, которые были экспрессированы при использовании тканеспецифических промоторов молочной железы; проведены работы и по продуцированию чГ-КСФ в этих экспрессионных системах.

Конструкция, несущая ген чГ-КСФ под контролем козьего бета-казеинового промотора, была введена в зиготы с помощью микроинъекции [14].

Уровень экспрессии в козьем молоке во время лактации составил 50 мкг/мл. Полученный целевой белок обладал биологической активностью, что было показано в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Проведены исследования экспрессии чГ-КСФ в молоко трансгенных кроликов. В зиготы вводилась конструкция, несущая чГ-КСФ под контролем бычьего  $\beta$ -лактоглобулинового промотора [1]. Достигнутый уровень экспрессии чГ-КСФ в молоке трансгенных кроликов достигал 22 мкг/мл. Отметим, что экспрессия чГ-КСФ приводила к проявлению сильного терратогенного эффекта: происходила гибель эмбриона на 2–4 неделе развития. Размножались только линии трансгенных кроликов с низким уровнем экспрессии.

Не так давно была достигнута трансгенная экспрессия чГ-КСФ в мочу мыши [13]. В разработанной авторами экспрессионной конструкции последовательность Г-КСФ находилась под контролем казеинового промотора. Использование мочевого пузыря в качестве биореактора имеет свои преимущества: получение целевого белка возможно на любой стадии жизненного цикла животного, а также не зависит от пола. Однако достигнутый уровень составлял лишь 500 мкг/мл, что недостаточно для практического использования. Полученный белок обладает биологической активностью, свойственной чГ-КСФ. При этом повышенный уровень Г-КСФ был отмечен и в крови трансгенных животных. Дальнейшие исследования показали, что происходит утечка целевого белка в кровеносную систему через окружающие мочевой пузырь сосуды. Проведенные дополнительно исследования позволяют предположить, что попадание рекомбинантного чГ-КСФ в кровеносную систему мышей не оказывает негативного влияния на животных.

Использование ретровирусных векторов, вводимых в бластомеру куриных эмбрионов, сделало возможным получить трансгенных цыплят, экспрессирующих чГ-КСФ [15]. Последовательность Г-КСФ была введена в ретровирусный вектор под контроль CMV-промотора. Сформированными вирусными частицами были инфицированы яйца. Рекомбинантный белок экспрессировался в крови цыплят и обладал биологической активностью, характерной для нативного чГ-КСФ. Приобретенный трансген наследовался следующим поколением, но потомство G<sub>1</sub> погибло спустя месяц после вылупления.

Интересной представляется экспрессия рекомбинантных белков в растительных культурах клеток. Использование таких экспрессионных систем имеет некоторые преимущества: возможно проведение посттрансляционных модификаций, растения просто и дешево выращивать и содержать. Проведен ряд экспериментов, в результате которых достигнута экспрессия чГ-КСФ в культурах клеток табака и риса. Уровень экспрессии в клетках табака был низок, составив 0,1 мкг/мл. Максимум белка был зафиксирован в культуральной среде на 9-й день инкубации, после чего резко снижался [10].

Новым подходом для продукции чГ-КСФ является использование систем растительной экспрессии на основе вирусных векторов [31]. Подобная система была разработана для продукции целевых белков в австралийском табаке *Nicotiana benthamiana*. Последовательность чГ-КСФ была клонирована в вирусный вектор под контроль актинового промотора. Далее с помощью агроинъекции вектора доставлялись в листья растения-хозяина, где через 4–5 дней наблюдали экспрессию чГ-КСФ. Уровень экспрессии достигал 500 мкг/кг зеленой массы. Очевидным преимущест-

вом данного метода является транзистентная (временная) экспрессия, позволяющая быстро нарабатывать необходимый белок.

Отметим, что при создании стабильно трансформированных растений количество продуцируемого ими белка составляет лишь 1 % от общего растворимого белка клетки. Растения, зараженные с помощью вирусных векторов, способны производить значительно большее количество целевого белка.

#### **Прокариотические продуценты чГ-КСФ**

В биотехнологии широко используются бактериальные системы экспрессии, позволяющие достигать высокого уровня продукции целевого белка, что, наряду с простотой культивирования, является несомненным преимуществом данного типа продуцентов.

Наиболее активно применяется рекомбинантный чГ-КСФ, поставляемый в продажу фирмой Amgen под международным названием филграстим (коммерческое название Нейпоген). Это негликозилированный аналог чГ-КСФ, выделенный из *E. coli*. Белок состоит из 175 аминокислотных остатков и имеет молекулярный вес 18 800 Да. Количество аминокислотных остатков больше, чем в аутентичном белке за счет присутствия N-концевого метионинового остатка. Период полужизни препарата составляет около 3,5 ч соответственно, для достижения терапевтического эффекта (повышения и поддержания должного уровня нейтрофилов) необходимы частые инъекции филграстима.

Этой же фирмой в 2002 г. был разработан пэгфилграстим – модифицированный аналог Нейпогена [28]. Особенность данного препарата – молекула чГ-КСФ через N-концевой лизин ковалентно связана с полиэтиленгликолем. Наличие ПЭГ-составляющей приводит к повышению стабильности препарата, увеличению продолжительности действия введенной дозы. Были проведены исследования по сравнению действия филграстима и пэгфилграстима на мышей, а также здоровых доноров. Было показано, что введение единичной дозы пэгфилграстима приводит к увеличению количества нейтрофилов, в то время как для филграстима сходный эффект достигается при ежедневном введении [21]. Препарат представлен на рынке под названием Неуласта.

Еще одним негликозилированным аналогом чГ-КСФ является нартограстим (производитель Куова Накко Когую), полученный и применяемый в Японии. В N-концевой области нартограстима заменено несколько аминокислот для достижения высокого уровня экспрессии в бактериальных системах [20]. По сравнению с филграстимом нартограстим обладает повышенной стабильностью. Как и филграстим, препарат влияет на дифференцировку, созревание нейтрофилов, ускоряет их перемещение из костного мозга в периферическую кровь.

В сравнительных исследованиях филграстима, ленограстима и нартограстима не было получено значимых различий. Все три препарата обладают сходными фармакокинетическими и фармакологическими эффектами, повышая уровень нейтрофилов. Можно предположить, что ни гликозилирование, ни изменение N-концевых аминокислот Г-КСФ не оказывает значительного влияния на действие на нейтрофилы *in vivo* [26]. В сравнении с негликозилированным филграстимом требуются менее частые инъекции ленограстима, предлагается вводить его один раз в день, что значительно упрощает проведение курса лечения [19].

В то же время, при сравнении граноцита с пэг-филграстимом, последний имеет больший период полужизни и также требует лишь однократного введения.

Существующие в настоящий момент рекомбинантные аналоги чГ-КСФ, полученные с использованием бактериальных продуцентов, экспрессируются в нерастворимой форме. Получение чГ-КСФ в растворимой форме позволило бы избежать дополнительных этапов очистки и упростить процесс получения рекомбинантного аналога этого белка. Экспрессионные системы, позволяющие получать чГ-КСФ в растворимой форме, в настоящий момент практически отсутствуют. Исследователи сталкиваются с тератогенным эффектом при продуцировании этого белка в организме различных трансгенных животных. Попытки экспрессировать чГ-КСФ в растворимой форме в бактериальных клетках приводили к гибели клеток при достижении высокого уровня продукции цитокина. Решением проблемы может являться использование белка-партнера, повышающего растворимость целевого белка. Конструирование экспрессионного вектора, в состав которого будут входить последовательности как целевого гена, так и высокорастворимого партнера, а также последующая экспрессия гибридного белка позволяет добиться продукции чГ-КСФ в растворимой форме.

В лаборатории трансгенных препаратов НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН подобрана технология, позволяющая получать чГ-КСФ в растворимой форме. Лабораторный штамм *Escherichia coli* продуцирует гибридный белок, в состав которого входит хитинсвязывающий домен, интеиновый домен и домен, соответствующий чГ-КСФ. Хитинсвязывающий домен отвечает за связывание гибридного белка с хитиновым сорбентом, что необходимо для проведения аффинной хроматографии при очистке цитокина.

Особенностью интеина является то, что он, оказываясь слит с целевым белком в составе гибридной конструкции, существенно повышает растворимость чГ-КСФ. Другое важное свойство интеина – его способность к автопротеолитическому вырезанию из состава гибридного белка. Автопротеолиз может индуцироваться действием тиольных реагентов.

Полученный в результате экспрессии гибридный белок, несущий в своем составе чГ-КСФ, находится в растворимой форме. При проведении очистки с помощью аффинной хроматографии гибридная белковая конструкция успешно связывается с хитиновым сорбентом, что свидетельствует о функциональной активности хитинсвязывающего домена. Автопротеолитическая активность интеина была индуцирована добавлением ДТТ, после чего домен, соответствующий чГ-КСФ, вырезался из состава белковой конструкции.

### Литература

1. Прокофьев М.И., Городецкий С.И., Мезина М.Н. и др. Создание трансгенных кроликов, продуцирующих с молоком человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – №. 6. – С. 48–54.
2. Avalos B.R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor // Blood. – 1996. – 88(3). – P. 761–77.
3. Bae C.S., Yang D.S., Chang K.R. et al. Enhanced secretion of human granulocyte colony stimulating factor directed by a novel hybrid fusion peptide from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* at high cell concentration // Biotechnol bioeng. – 1998. – 57. – P. 600–9.
4. Bae C.S., Yang D.S., Lee J., Park Y-P. Improved process for production of recombinant yeast-derived monomeric human G-CSF // Appl. Microbiol Biotechnol. – 1999. – 52. – P. 338–44.
5. Bahrami A., Shojaosadati A., Khakikzadeh R. et al. Prevention of human granulocyte colony-stimulating factor protein aggregation in recombinant *Pichia pastoris* fed-batch fermentation using additives // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2009. – 52. – P. 141–8.
6. Cappello F., Stassi G., Lazzereschi D. et al. hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer // Transplantation Proceedings. – 2000. – 32. – P. 895–6.

Элюированный чГ-КСФ находился в растворимой форме и обладал биологической активностью, соответствующей коммерческому аналогу – филграстиму.

Описанная выше экспрессионная система может быть с успехом применена и для других белков, которые склонны формировать тельца включения при использовании бактериальных продуцентов или их экспрессия токсична для экспрессирующих клеток.

### Заключение

Таким образом, при всем разнообразии экспрессионных систем в настоящий момент оптимальным представляется использование бактериальных продуцентов. Получение рекомбинантных терапевтических белков этим путем существенно выгоднее, чем с использованием клеточных линий или трансгенных животных. Несмотря на то, что при эукариотической экспрессии белки подвергаются должному гликозилированию, это не всегда необходимо для проявления биологической активности, как и в случае с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором. Кроме того, эукариотические системы экспрессии не позволяют нарабатывать токсичные для клетки белки в больших количествах.

При формировании телец включения в бактериальных клетках белок не является активным, так как накапливается в клетке в качестве нерастворимых клеточных агрегатов. Для получения биологически активного белка требуется проведение рефолдинга, что усложняет проведение очистки целевого белка, но все же остается эффективным с экономической точки зрения. Другим перспективным подходом является описанный выше метод экспрессии целевого белка слитно с белком-партнером. Экспрессия гибридного белка позволяет получать последний в растворимой форме, проводить высокоэффективную аффинную очистку. При этом биологическая активность целевого белка (в частности, чГ-КСФ) проявляется только после вырезания целевого белка из состава гибридной конструкции в процессе хроматографической очистки.

Несмотря на то, что достигнутый к настоящему моменту уровень экспрессии по гибридной технологии сравнительно невысок и находится на нижней границе экономически эффективного диапазона, вполне вероятно, что проводимые исследования позволят повысить уровень экспрессии до требуемого производством уровня. Применение гибридных конструкций, в которых биологическая активность целевого белка ингибирована, сделает возможным получение рекомбинантного чГ-КСФ и других терапевтически важных белков в растительных и животных продуцентах.

7. *Chan A.W.S., Homan E.J., Ballou L.U. et al.* Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – 95. – P. 14028–33.
8. *Fernandez-Varon E., Villamayr L.* Granulocyte and granulocyte macrophage colony-stimulating factors as therapy in human and veterinary medicine // *The Veterinary Journal.* – 2007. – 174. – P. 33–41.
9. *Golde D., Cline M.* Regulation of granulopoiesis // *N England J Med.* – 1974. – 291(26). – P. 1388–95.
10. *Hill C.P., Osslund T.D., Eisenberg D.* The structure of granulocyte colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors // *Biochemistry.* – 1993. – 90. – P. 5167–71.
11. *Hellwig S., Drossard J., Twyman R.M., Fischer R.* Plant cell cultures for the production of recombinant proteins // *Nature Biotechnology.* – 2004. – 22(11). – P. 1415–22.
12. *Kaufman R.J.* Overview of vector design for mammalian gene expression // *Molecular biotechnology.* – 2000. – 16. – P. 151–60.
13. *Kim M.O., Kim S.H., Lee S.R. et al.* Transgene expression of biological active recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) into mouse urine // *Life Sciences.* – 2006. – 78. – P. 1003–9.
14. *Ko J.H., Lee C.-S., Kim K.H. et al.* Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat // *Transgenic Research.* – 2000. – 9. – P. 215–22.
15. *Kwon M.S., Koo B.C., Choi B.R. et al.* Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor // *Molecular reproduction and development.* – 2008. – 75. – P. 1120–6.
16. *Lasnik M.A., Porekar V.G., Stalc A.* Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) expressed by methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *Eur O Physiol.* – 2001. – 442. – Suppl. 1. – R. 184–6.
17. *Lazzereschi D., Forni M., Cappello F. et al.* Efficiency of transgenesis using sperm-mediated gene transfer: generation of hDAF transgenic pigs // *Transplantation Proceedings.* – 2000. – 32. – P. 892–4.
18. *Lu C.-Z., Xiao B.-G.* G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia // *Biochemical society transactions.* – 2006. – 34(6). – P. 1327–33.
19. *Martin-Christin F.* Granulocyte colony-stimulating factors: How different are they? How to make a decision? // *Anti-Cancer Drugs.* – 2001. – 12. – P. 185–91.
20. *Maruyama K., Tsuji K., Tanaka R. et al.* Characterization of peripheral blood progenitor cells mobilized by nartograstim in normal volunteers // *Bone Marrow Transplantation.* – 1998. – 22. – P. 313–20.
21. *Molineux G.* Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients // *Anti-Cancer Drugs.* – 2003. – 14(4). – P. 259–65.
22. *Nagata T., Tohda Y., Yokomizo Y. et al.* High level expression, purification, and in vivo activity of bovine granulocyte colony-stimulating factor produced using baculovirus system // *Veterinary immunology and immunopathology.* – 2003. – 96. – P. 105–10.
23. *Ogilvie G.K., Obradovich J.E., Cooper M.F. et al.* Use of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor to decrease myelosuppression associated with the administration of mitoxantrone in the dog // *J Vet Intern Med.* – 1992. – 6(1). – P. 44–7.
24. *Sachs L.* The molecular control of blood cell development // *Science.* – 1987. – 238. – P. 1374–9.
25. *Simons J.P., McClenaghan M., Clark A.J.* Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice // *Nature.* – 1987. – 328(6130). – P. 530–2.
26. *Takano H., Komuro I.* G-CSF therapy for acute myocardial infarction: studies of animal experiments give valuable hints to clinical trials // *International Journal of Cardiology.* – 2009. – 135. – P. 115–6.
27. *Tanaka H., Tanaka Y., Shinagawa K. et al.* Three types of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor have equivalent biological activities in monkeys // *Cytokine.* – 1997. – 9(5). – P. 360–9.
28. *Willis F., Pettengell R.* Pegfilgrastim // *Expert Opin Biol Ther.* – 2002. – 2(8). – P. 985–92.
29. *Yamamoto A., Iwata A., Saithoh T. et al.* Expression in *Escherichia coli* and purification of the functional feline granulocyte colony-stimulating factor // *Veterinary immunology and immunopathology.* – 2002. – 90. – P. 169–77.
30. *Yamamoto A., Iwata A., Saito T. et al.* Expression and purification of canine granulocyte colony-stimulating factor // *Veterinary immunology and immunopathology.* – 2009. – 130. – P. 221–5.
31. *Zvereva A.S., Petrovskaya L.E., Rodina AV. et al.* Production of biologically active human myelocytokines in plants // *Biochemistry (Mosc).* – 2009. – 74(11). – P. 1187–94.

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

Все страницы должны быть пронумерованы. Номер страницы должен быть расположен внизу справа, начиная со второй. Каждый абзац должен начинаться с красной строки, которая устанавливается меню «Абзац».

Не следует использовать для красной строки клавишу Tab. Десятичные дроби следует писать через запятую. При наборе текста следует различать дефис и тире. Последнее вводится одновременным нажатием клавиш Ctrl+Alt+дефис с дополнительной клавиатуры при горящем указателе Num Lock.

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

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

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

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

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

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.24-006.6:577.2.08:576.385.5

*А.А. Коломейцева, Е.В. Степанова, И.М. Гагарин, Е.Г. Родникова, Д.С. Рзаев, В.А. Горбунова, А.Ю. Барышников***ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО***РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Коломейцева Алина Андреевна, врач-онколог отделения химиотерапии НИИ клинической онкологии***адрес:** 115448, Москва, Каширское ш., д. 24; **тел.:** +7(495)324-94-79**e-mail:** [almed2002@mail.ru](mailto:almed2002@mail.ru)

Статья поступила: 03.05.2011, принята к печати 20.10.2011

**Резюме**

Цель нашей работы – изучение взаимосвязи молекулярно-биологических маркеров апоптоза, ангиогенеза и пролиферации (EGFR, HIF-1 $\alpha$ , PTEN, pAkt, VEGFR2, VEGF) в ткани опухоли легкого с эффективностью терапии ингибиторами EGFR больных распространенным НМРЛ. Для исследования использовали биопсийный материал опухолевой ткани легкого, полученный от 38 больных до начала специфического лечения. Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Объективный эффект у больных с экспрессией белка EGFR составил 28,6 %, без экспрессии – 12,9 % (p=0,3). Медиана времени до прогрессирования у больных с наличием или отсутствием экспрессии EGFR составила 3и 2,8 мес. соответственно (p=0,9). Медиана общей выживаемости у больных с экспрессией рецептора EGF составила 7 мес., в то время как МОВ больных без экспрессии белка не достигнута. У больных с экспрессией pAkt в опухоли ОЭ составил 19,2 % по сравнению с 8,3 % в группе без экспрессии pAkt (p=0,4). МВДП у больных с положительной по экспрессии pAkt опухолью была 3 мес. с отрицательной – 2 мес. (p = 0,2), МОВ – 14,7 и 2,9 мес. соответственно (p=0,4). У больных с положительной по HIF-1 $\alpha$  опухолью ОЭ составил 8,7 %, с отрицательной по HIF-1 $\alpha$  – 26,6 % (p=0,2), МВДП – 2,7 и 3мес. (p=0,4), МОВ – 7,6 и 14,5 мес. соответственно (p=0,6). ОЭ у больных с опухолью, положительной по экспрессии PTEN, составил 8 %, с отрицательной – 30,8 % (p=0,1), МВДП составила 2,7 и 3 мес. (p=0,4), МОВ – 11,7 и 5,5 мес. (p=1) соответственно. VEGFR2 не влиял ни на один из параметров эффективности терапии, включая непосредственный эффект (p=0,5), время до прогрессирования (p=0,5) и выживаемость (p=0,2). Подобным образом VEGF не влиял на ОЭ (p=0,4), МВДП (p=0,4) и МОВ (p=0,1). Таким образом, надежных критериев, помогающих предсказать эффективность ингибиторов тирозинкиназ, среди изученных маркеров не обнаружено.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, специфические белки-маркеры НМРЛ (EGFR, HIF-1 $\alpha$ , PTEN, pAkt, VEGFR2, VEGF), эрлотиниб, gefitinиб.

*A.A. Kolomeytseva, E.V. Stepanova, I.M. Gagarin, E.G. Rodnikova, D.S. Rzaev, V.A. Gorbunova, A.Yu. Baryshnikov***THE IMPACT OF MOLECULAR MARKERS ON EFFICACY****OF EGFR INHIBITORS****IN PATIENTS WITH NON SMALL-CELL LUNG CANCER***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

The purpose of this study was to detect the relationship between biological markers of apoptosis, angiogenesis and proliferation (EGFR, HIF-1  $\alpha$ , PTEN, pAkt, VEGFR2, VEGF) in lung cancer tissues and efficacy by EGFR inhibitors therapy. The biopsy material tissue was received from 38 patients with NSCLC. The overall response rate (ORR) in patients with EGFR IHC<sup>+</sup> was 28,6 % and EGFR IHC<sup>-</sup> – 12,9 % (p=0,3), the median time to progression (TTP) – 3 and 2,8 months (p=0,9) respectively. Overall survival (OS) in patients with EGFR IHC<sup>+</sup> – 7 months and was not reached for EGFR IHC<sup>-</sup> patients. The pAkt IHC<sup>+</sup> patients, compared with pAkt IHC<sup>-</sup> patients had non-statistically significantly higher ORR (19,2 % versus 8,3 %; p=0,4), longer time to progression (3 versus 2 months; p=0,2), and longer survival (14,7 versus 2,9 months; p=0,4). ORR in patients with HIF-1  $\alpha$  IHC<sup>+</sup> was 8,7 % (p=0,2) and HIF-1  $\alpha$  IHC<sup>-</sup> – 26,6 %, TTP – 2,7 and 3 months (p=0,4) respectively. OS in patients with HIF-1  $\alpha$  IHC<sup>+</sup> was 7,6 vs. 14,5 months in patients with HIF-1  $\alpha$  IHC<sup>-</sup> (p=0,6). The differences between patients with PTEN IHC<sup>+</sup> and PTEN IHC<sup>-</sup> were not statistically significant in ORR (8 % vs. 30,8 %, p=0,1), TTP (3 vs. 2,7 months, p=0,4) and OS (11,7 and 5,5 months, p=1). VEGF and VEGFR2 expression did not significantly correlate with objective response, TTP and OS. Thus, we couldn't identify predictors of the efficacy of EGFR inhibitors among the studied parameters.

**Key words:** EGFR, HIF-1 $\alpha$ , PTEN, pAkt, VEGFR2, VEGF, erlotinib, gefitinib, non small-cell lung cancer.

**Введение**

Рак легкого остается лидирующей причиной смерти от онкологических заболеваний в мире. В

Российской Федерации ежегодно регистрируется около 63 тыс. новых случаев рака легкого. На долю НМРЛ приходится примерно 85 % всех случаев рака легкого [1; 6].

Зачастую заболевание выявляется на поздних стадиях, когда выполнить оперативное лечение таким больным не представляется возможным. В этих случаях на первое место выходят консервативные методы лечения – лучевая и лекарственная терапия. В настоящее время химиотерапия на основе препаратов платины (цисплатин и карбоплатин) в комбинации с цитотоксическими агентами 3-й генерации (гемцитабин, паклитаксел, доцетаксел, винорельбин) является стандартным подходом в терапии больных распространенным НМРЛ [10].

Все большую актуальность для современной химиотерапии приобретает индивидуальный подход к подбору препаратов и их доз, направленный на повышение эффективности и уменьшение токсичности противоопухолевых средств. Активно ведется поиск биологических и молекулярно-генетических маркеров, позволяющих предсказать, какие препараты окажутся эффективными у конкретного больного.

Белок EGFR, определяемый ИГХ-методом в ткани опухоли легкого, явился первой мишенью для изучения ее в качестве биологического маркера эффективного лечения ингибиторами EGFR. Синтез данного белка осуществляется в 50–90 % клеток НМРЛ. В связи с эффективностью ингибиторов EGFR при некоторых типах НМРЛ была выдвинута гипотеза о том, что наличие белка EGFR в опухоли может быть показателем эффективности анти-EGFR терапии [3]. Однако взаимосвязь между присутствием EGFR и чувствительностью НМРЛ к ингибиторам тирозинкиназ большинством исследований не доказана [2; 4; 11].

Целью нашей работы было изучение молекулярно-биологических маркеров апоптоза, ангиогенеза и пролиферации (EGFR, HIF-1 $\alpha$ , PTEN, pAkt, VEGFR2, VEGF) в ткани опухоли легкого в качестве возможных маркеров эффективности ингибиторов EGFR у больных распространенным НМРЛ.

### Материалы и методы

В исследование включались больные неоперабельным или рецидивным НМРЛ, у которых отмечалось прогрессирование на первой и/или второй линии стандартных режимов химиотерапии. Лечение проводилось двумя ингибиторами рецептора эпидермального фактора роста: gefitinибом в дозе 250 мг и эрлотинибом в дозе 150 мг на прием ежедневно непрерывно до прогрессирования или развития тяжелой токсичности. Пациенты, получающие лечение ингибиторами тирозинкиназ в сочетании с химиотерапией, в анализ не включались.

Все иммуногистохимические исследования проводили в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для исследования использовали биопсийный материал опухолей 38 больных до начала специфического лечения.

ИГХ-анализ проводили на срезах с парафиновых блоков, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Использованные в работе первичные антитела и их разведения представлены в табл. 1.

Таблица 1

Панель антител, использованных в исследовании

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
EGFR	31G7	Zymed	1:25	Протеиназа К
pAkt	Phosphor T308	Abcam	1:500	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)
HIF-1 $\alpha$	HIF1alpha67	Abcam	1:200	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)
VEGFR2	A-3	Santa Cruz Biotech	1:500	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)
PTEN	VP-P985	Vector	1:200	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)
VEGF	C-1	Santa Cruz Biotech	1:500	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике.

Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали DAB+ систему [DAKO].

Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в синтетическую основу.

В работе были использованы следующие критерии оценки экспрессии молекулярно-биологических маркеров и разделения опухолей на положительные или отрицательные по их экспрессии:

1. Для EGFR оценивали наличие мембранного окрашивания. Экспрессию оценивали как:

- 0 при отсутствии окрашивания или окрашивании менее 5 % опухолевых клеток;
- 1<sup>+</sup> при окрашивании 5–19 % опухолевых клеток;
- 2<sup>+</sup> при окрашивании 20–49 % опухолевых клеток;
- 3<sup>+</sup> при окрашивании 50–70 % опухолевых клеток;
- 4<sup>+</sup> при окрашивании более 70 % опухолевых клеток.

При оценке экспрессии 2<sup>+</sup> или выше опухоль рассматривали как положительную по экспрессии EGFR;

2. Экспрессию в опухоли pAkt оценивали как:

- 0 при отсутствии окрашивания;
- 1<sup>+</sup> при слабом гомогенном окрашивании

цитоплазмы без наличия очагов гранулярного окрашивания;

- 2<sup>+</sup> или 3<sup>+</sup> при наличии гранулярного цитоплазматического окрашивания высокой интенсивности менее 20 % опухолевых клеток (2<sup>+</sup>) или более 20 % опухолевых клеток (3<sup>+</sup>).

При оценке экспрессии как 2<sup>+</sup> или выше опухоль рассматривали как положительную по экспрессии pAkt;

3. Экспрессию HIF-1 $\alpha$  оценивали как:

- 0 при отсутствии окрашивания опухолевых клеток;
- 1<sup>+</sup> при окрашивании менее 1 % ядер опухолевых клеток;
- 2<sup>+</sup> при окрашивании ядер 1–10 % опухолевых клеток и/или слабом окрашивании цитоплазмы;
- 3<sup>+</sup> при окрашивании ядер 10–50 % клеток и/или среднем окрашивании цитоплазмы;
- 4<sup>+</sup> при окрашивании ядер более 50 % опухолевых клеток и/или сильном окрашивании цитоплазмы.

При оценке экспрессии 3<sup>+</sup> или выше опухоль рассматривали как положительную по экспрессии HIF-1 $\alpha$ ;

4. Экспрессию PTEN в ядрах опухолевых клеток определяли при сравнении с экспрессией белка в эндотелии сосудов, который служил внутренним положительным контролем. Экспрессию PTEN в опухолевых клетках оценивали как:

- 0 при отсутствии окрашивания;
- 1<sup>+</sup> при интенсивности окрашивания опухолевых клеток ниже эндотелия сосудов;
- 2<sup>+</sup> при интенсивности окрашивания эквивалентной эндотелию;
- 3<sup>+</sup> при более высокой интенсивности окрашивания.

При оценке экспрессии как 0 или 1+ опухоль оценивали как с потерей PTEN;

5. Опухоль считали положительной по экспрессии VEGF и VEGFR2, если окрашивалось более 25 % опухолевых клеток с любой интенсивностью окрашивания [8; 9; 12].

Для статистической обработки данных использовали пакет программ STATISTICA® 6.0 [О.Ю. Реброва, 2003]. Достоверность различий оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ , в случае малых выборок рас-

считывался точный критерий Фишера. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Кривые выживаемости были построены по методу Каплан–Майера, для сравнения между группами использовался критерий log rank.

### Результаты и обсуждение

Клинические характеристики больных обобщены в табл. 2.

Для всех пациентов в рамках исследования изучали наличие специфических белков-маркеров: EGFR, HIF-1 $\alpha$ , PTEN, pAkt, VEGFR2, VEGF и их связь с непосредственными и отдаленными результатами лечения больных распространенным НМРЛ. Результаты иммуногистохимического исследования по всем маркерам представлены в табл. 3.

Таблица 2

Больные распространенным НМРЛ (38), получавшие лечение ингибиторами EGFR		п больных (%)
Критерий		
Препарат		
Гефитиниб		33 (86,8)
Эрлотиниб		5 (13,2)
Пол		
Мужчины		23 (60,5)
Женщины		15 (39,5)
Курение		
Курильщики		8 (21)
Некурящие		27 (71)
Бывшие курильщики		3 (8)
Гистологический вариант опухоли		
Аденокарцинома		32 (84,2)
Плоскоклеточный рак		6 (15,8)

Таблица 3

Распределение больных в зависимости от исследуемых маркеров		Число больных, n (%)
Белок		
EGFR		31 (81,6)
pAkt		26 (68,4)
HIF-1 $\alpha$		23 (60,5)
VEGFR2		28 (73,7)
PTEN		25 (65,8)
VEGF		30 (79)

Опухоль считалась положительной по экспрессии EGFR у 31 больного (81,6 %) и отрицательной – у 7 (18,4 %) больных (рис. 1; см. вклейку). Заметной зависимости непосредственной эффективности лечения от экспрессии рецептора не обнаружено. Частота объективного эффекта у больных с экспрессией белка EGFR составила 28,6 % (4 больных), без экспрессии – 12,9 % (2 больных), однако эти различия были далеки ( $p=0,3$ ) от уровня статистической значимости (рис. 2). Медиана времени до прогрессирования процесса у больных с наличием или отсутствием рецептора EGF практически не отличалась и составила 2,8 и 3 мес. соответственно. Данные различия (рис. 3) статистически не значимы (log-rank test,  $p=0,9$ ). Медиана ОБ у больных с экспрессией EGFR составила 7 мес., в то время как медиана выживаемости больных без экспрессии белка не достигнута. Таким образом, присутствие рецептора EGF в опухоли легкого не оказывало статистически значимого влияния на эффективность лечения и время до прогрессирования. Опухоль считалась положительной по pAkt у 26 больных (68,4 %) и отрицательной – у 12 (31,6 %) больных (рис. 4). У больных с отсутствием pAkt в опухоли частота ремиссий составила 8,3% (1 больной) по сравнению с 19,2 % (5 больных) в группе с наличием pAkt, контроль роста опухоли – 33,3 % (4 больных) по сравнению с 50 % (13 больных) соответственно. Однако различия оказались статистически не значимы ( $p=0,4$ ) (рис. 5). Медиана времени до прогрессирования заболевания у больных с отрицательной по pAkt опухолью была 2 мес., с положительной – 3 мес.

(log-rank test,  $p = 0,2$ ). Медиана ОБ в группе больных с наличием pAkt составила 14,7 мес. по сравнению с 2,9 мес. в группе с отсутствием белка. Различия также статистически не значимы (log-rank test,  $p = 0,4$ ) (рис. 6). С помощью иммуногистохимического окрашивания был проведен анализ на фактор, вызванный гипоксией (HIF-1 $\alpha$ ), который присутствовал у 23 больных (60,5 %) и отсутствовал у 15 (39,5 %) пациентов (рис. 7, А, Б). При анализе непосредственной эффективности лечения оказалось, что у больных, чья опухоль была отрицательной по экспрессии HIF-1 $\alpha$ , частота объективного ответа составила 26,6 % (4 пациента), контроль роста опухоли – 60 % (9 пациентов). У больных с положительной по экспрессии HIF-1 $\alpha$  опухолью показатели эффективности лечения и контроля заболевания были хуже и составили 8,7 % (2 пациента) и 39 % (9 пациентов) соответственно. Однако различия не достигли ( $p=0,2$  и  $p=0,3$  соответственно) статистической значимости (рис. 8). Фактор, индуцируемый гипоксией, практически не оказывал влияния на отдаленные результаты лечения ингибиторами EGFR. Медиана времени до прогрессирования у больных с положительной по HIF-1 $\alpha$  опухолью была 2,7 мес., с отрицательной – 3 мес. (log-rank test,  $p=0,4$ ). Медиана ОБ оказалась короче в группе больных с наличием экспрессии HIF-1 $\alpha$  – 7,6 мес., чем в группе с отсутствием экспрессии белка – 14,5 мес. Различия также (log-rank test,  $p=0,6$ ) статистически не значимы (рис. 9). Опухолевый супрессор PTEN был найден у 25 больных (65,8 %), потеря PTEN выявлена у 13 (34,2 %) больных (рис. 10, А, Б).

Эффективность лечения у больных с опухолью, отрицательной по PTEN, была 30,8 % (4 больных), тогда как при наличии экспрессии PTEN она составила всего 8 % (2 больных). Однако различия не были статистически значимы ( $p=0,1$ ). Заметных различий во времени до прогрессирования и выживаемости между больными с наличием или отсутствием экспрессии PTEN в опухоли также обнаружить не удалось. Медиана времени до прогрессирования составила 2,7 и 3 мес. соответственно (log-rank test,  $p=0,4$ ), медиана общей выживаемости – 11,7 и 5,5 мес. (log-rank test,  $p=1$ ) соответственно (рис. 11). VEGFR-2 определялся у 28 больных (73,7 %) и отсутствовал у 10 больных (26,3 %). Рецептор не влиял ни на один из параметров эффективности терапии, включая непосредственный эффект ( $p=0,5$  для критерия Фишера), время до прогрессирования (log-rank test,  $p=0,5$ ) и выживаемость (log-rank test,  $p=0,2$ ). Подобным же образом фактор роста эндотелия (VEGF) не влиял на частоту общего ответа ( $p=0,4$  для критерия Фишера) и не коррелировал со временем до прогрессирования (log-rank test,  $p=0,4$ ) и выживаемостью (log-rank test,  $p=0,1$ ). С помощью ИГХ-исследования нами проведен анализ специфических белков в опухоли EGFR, HIF-1 $\alpha$ , PTEN, pAkt, VEGFR-2, VEGF и их связь с эффективностью лечения эрлотинибом и gefитинибом. В нашем исследовании эффективность лечения ( $p=0,5$ ) и время до прогрессирования ( $p=0,9$ ) не зависели от экспрессии EGFR в опухоли легкого. Ретроспективный анализ рандомизированных плацебо-контролируемых исследований с ингибиторами EGFR (ISEL, BR.21) также не выявил явной зависимости между наличием рецептора в опухоли легкого и эффективностью лечения. Хотя в исследовании BR.21 присутствие EGFR в опухоли и не влияло на показатели выживаемости ( $p=0,25$ ), непосредственный лечебный эффект эрлотиниба у таких больных ( $p=0,03$ ) был достоверно лучше [11]. Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1 $\alpha$ ), как правило, связан с плохим прогнозом заболевания и худшими показателями выживаемости, особенно в сочетании с отсутствием рецептора EGF в опухоли [7]. В нашей работе HIF-1 $\alpha$  присутствовал в опухоли более чем у половины больных (60,5 %) и ухудшал показатели непосредственной эффективности лечения. Однако он мало влиял на отдаленные результаты терапии ингибиторами EGFR. Медиана времени до прогрессирования у больных с положительной и отрицательной по экспрессии HIF-1 $\alpha$  опухолью была практически одинаковой ( $p=0,4$ ), медиана общей выживаемости оказалась несколько короче в группе больных с экспрессией HIF-1 $\alpha$ , но различия не достигли статистической значимости ( $p=0,4$ ).

### Литература

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2006 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 19, №2 (прил. 1).
2. Cappuzzo F., Hirsch F.R., Rossi E. et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer // J. Nat. Cancer Inst. – 2005 – 97. – P. 643–55.
3. Giaccone G. HER1/EGFR-targeted agents: Predicting the future for patients with unpredictable outcomes to therapy // Ann. Oncol. – 2005. – 16. – P. 538–48.
4. Hirsch F.R., Varella-Garcia M., Bunn P.A. et al. Molecular Predictors of Outcome With Gefitinib in a Phase III Placebo-Controlled Study in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer // J. Clin. Oncol. – 2006 – 24. – P. 5034–42.
5. Lim W.T., Zhang W.H., Miller C.R. et al. PTEN and phosphorylated AKT expression and prognosis in early- and late-stage non-small cell lung cancer // Oncol. Rep. – 2007 – 17(4). – P. 853–7.
6. Novello S., Le Chevalier T. Chemotherapy for NCSLC. Part 1: early stage disease // Oncology. – 2003. – 17. – P. 357–64.
7. Park S., Ha S.Y., Cho H.Y. et al. Prognostic implications of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in epidermal growth factor receptor-negative non-small cell lung cancer // Lung Cancer. – 2010 – 72(1). – P. 100–7.
8. Perren A., Weng L.P., Boag A.H. et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast // Am. J. Pathol. – 1999 – 155. – P. 1253–60.
9. Rusch V., Klimstra D., Venkatraman E. et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression // Clin. Cancer Res. – 1997 – 3. – P. 515–22.
10. Socinski M.A. The role of chemotherapy in the treatment of unresectable stage III and IV non-small cell lung cancer // Respir. Care Clin. N. Am. – 2003 – 9. – P. 207–36.
11. Tsao M.S. et al. Erlotinib in lung cancer-molecular and clinical predictors of outcome//N. Engl. J. Med. – 2005. –353. – P. 133–44.
12. Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancer and their metastases // Cancer Res. – 1999 – 59. – P. 5830–5.

При анализе прогностических данных существенную роль играет оценка состояния в опухоли легкого маркеров PTEN и pAkt как важных участников PI3K/Akt-проводящего пути, регулирующего сигнальную трансдукцию от рецептора EGF. Как известно, опухоли с потерей функции PTEN и большим количеством pAkt (не менее 2<sup>+</sup>) имеют более агрессивное течение, демонстрируя устойчивость к ингибиторам EGFR [5]. В нашей работе потеря PTEN была выявлена в 34,2 % случаев, что меньше ожидаемого, учитывая распространенность заболевания у пациентов. Эффективность лечения, напротив, у больных с опухолью отрицательной по экспрессии PTEN, была лучше. Нам также не удалось обнаружить заметных различий во времени до прогрессирования и выживаемости между больными с наличием или отсутствием экспрессии PTEN в опухоли. Подобная картина наблюдалась и в отношении pAkt. Больные с большим количеством этого белка имели лучше показатели эффективности лечения, чем больные, чья опухоль не продуцировала pAkt. Некоторое несоответствие наших результатов с литературными данными может объясняться небольшим числом больных в выборке и при достаточном наборе позволит сделать статистически обоснованные выводы. EGFR и VEGF имеют общие сигнальные пути. Рецептор EGF стимулирует продукцию VEGF в опухолевых клетках, и связанные с опухолью клетки эндотелия активизируют EGFR. В своей работе мы оценили наличие VEGFR-2 и VEGF у 38 больных и их связь с непосредственными и отдаленными результатами лечения ингибиторами тирозинкиназ. Данные маркеры не влияли ни на один из параметров эффективности терапии, включая непосредственный эффект, время до прогрессирования и выживаемость. Несмотря на отсутствие корреляции между биологическими маркерами ангиогенеза и результатами терапии, определение VEGF-A и/или VEGFR2 может играть большую роль при назначении моноклональных антител или ингибиторов тирозинкиназ, блокирующих образование сосудов.

### Заключение

Таким образом, надежных критериев, помогающих предсказать эффективность ингибиторов тирозинкиназ, среди изученных маркеров не обнаружено. Дальнейшие молекулярно ориентированные исследования помогут максимально индивидуализировать лечебный процесс у конкретного больного и достичь высоких результатов противоопухолевой терапии при распространенном НМРЛ.

УДК 616-006.81-097:615.371

Н.В. Голубцова<sup>1</sup>, И.Н. Михайлова<sup>1</sup>, К.А. Парсункова<sup>2</sup>, Н.В. Балацкая<sup>2</sup>, К.А. Барышников<sup>1</sup>, И.В. Евсегнеева<sup>3</sup>,  
М.В. Огородникова<sup>1</sup>, И.В. Манина<sup>1</sup>, И.Н. Григорьева<sup>1</sup>, Е.В. Коржевская<sup>1</sup>, Г.З. Чкадуа<sup>1</sup>, Л.В. Демидов<sup>1</sup>,  
А.Ю. Барышников<sup>1,3</sup>, Ю.В. Шшикин<sup>1</sup>

## ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ

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

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

<sup>3</sup>Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Москва

### Контактная информация:

Голубцова Наталья Валерьевна, научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии НИИ ЭДнТО

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

e-mail: ngolubcova@mail.ru

Статья поступила: 26.11.2010, принята к печати 25.10.2011

### Резюме

Исследовано относительное содержание интерлейкина-2 (ИЛ-2) в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой (n=48) в процессе вакцинотерапии дендритными клетками. В зависимости от исходных уровней пациенты делились на две группы (с повышенными и пониженными значениями ИЛ-2) относительно показателей в контрольной группе доноров. Был проведен анализ выживаемости больных в зависимости от начального уровня относительного содержания ИЛ-2 в образцах сыворотки крови пациентов в обеих группах. Медиана выживаемости пациентов с исходно повышенными значениями ИЛ-2 составила 34,0±4,6 мес. В группе с пониженными значениями ИЛ-2 медиана выживаемости составила 24,0±16,7 мес. (p=0,131). Установлено повышение уровня относительного содержания ИЛ-2 у 85,4 % больных в ходе лечения.

**Ключевые слова:** цитокины, иммунная система, вакцина, дендритные клетки, меланома.

N.V. Golubzsova<sup>1</sup>, I.N. Mikhailova<sup>1</sup>, K.A. Parsunkova<sup>2</sup>, N.V. Balazskaya<sup>2</sup>, K.A. Baryshnikov<sup>1</sup>, I.V. Evsegneeva<sup>3</sup>,  
M.V. Ogorodnikova<sup>1</sup>, I.V. Manina<sup>1</sup>, I.N. Grigorieva<sup>1</sup>, E.V. Korjevskaja<sup>1</sup>, G.Z. Chkadua<sup>1</sup>, L.V. Demidov<sup>1</sup>,  
A.Yu. Baryshnikov<sup>1,3</sup>, Yu. V. Shishkin<sup>1</sup>

## VARIATION OF THE RELATIVE INTERLEUKIN-2 MAINTENANCE IN PATIENTS WITH DISSEMINATED MELANOMA DURING VACCINE THERAPY

<sup>1</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

<sup>2</sup>«Intermedbiophyschem», Moscow

<sup>3</sup>I.M. Sechenov Moscow State Medical University

### Abstract

We have investigated the relative abundance of interleukin-2 (IL-2) in the serum of patients with disseminated malignant melanoma (n=48) during dendritic cell vaccine therapy. Depending on the baseline, patients were divided into two groups (with higher values of IL-2 and lower values) with respect to indicators in the control group of donors. The analysis was conducted in patient survival depending on the initial level of relative content of IL-2 in serum samples of patients in both groups. Median survival for patients with initially elevated values of IL-2 was 34,0±4,6 months. In the group with lower values of IL-2, median survival was 24,0±16,7 months (p=0,131). Established increase in the relative content of IL-2 in 85.4% of patients during treatment.

**Key words:** cytokines, immune system, vaccine, dendritic cells, melanoma.

### Введение

В последнее время одним из методов лечения онкологических заболеваний, в частности меланомы, является вакцинотерапия [1; 2; 4; 9]. Принцип данного метода основан на индукции противоопухолевого иммунитета после введения в организм опухолевых антигенов [23].

T-лимфоциты, играющие роль в клеточно-опосредованном иммунитете, распознают аутологичные и аллогенные опухоли с рестрикцией по антигенам главного комплекса гистосовместимости. Активация иммунной системы может останавливать пролиферацию микрометастатических очагов опухолевых клеток, персистирующих в организме больных злокачественными новообразованиями после циторедуктивных вмешательств [1; 4; 5]. Меланома считается иммуногенной опухолью, экспрессирующей

опухолеассоциированные антигены, представляемые T-лимфоцитами на основе молекул главного комплекса гистосовместимости I класса. Специфический клеточный иммунный ответ на меланомные антигены происходит путем узнавания чужеродных пептидов рецепторами T-клеток посредством молекул главного комплекса гистосовместимости дендритных клеток [7]. Вакцины с опухолеспецифичными антигенами вызывают специфический (T-клеточный) ответ иммунной системы [4].

Межклеточная сигнализация в иммунной системе осуществляется не только при взаимодействии клеток с антигеном или друг с другом, но и с помощью интерлейкинов [12; 26]. Характер опухолевого роста во многом зависит от эффективности иммунологических защитных механизмов и от способности трансформированных клеток уходить от иммунологического надзора.

Изменение равновесия клеточного Th1 и гуморального Th2 приводит к существенным изменениям иммунных реакций у больных с меланомой [17; 23; 30]. В некоторых работах было показано, что пациенты с метастатической меланомой на поздних стадиях течения заболевания существуют в состоянии Th2-опосредованного «хронического воспаления» [14; 16; 19], что обусловлено увеличением концентрации интерлейкинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10) в периферической крови и продукцией инфильтрирующих опухоль лимфоцитов. Было выявлено, что преобладание данных цитокинов приводит к прогрессированию заболевания и увеличению процессов метастазирования [8; 13; 17; 18; 22; 24]. Пациенты с прогрессирующей меланомой имели преобладающие реакции Th2-типа против эпитопов MAGE-6 независимо от их стадии заболевания (стадия I в сравнении с IV), в то время как нормальные доноры и больные меланомой без текущего признака болезни имели выраженные Th1 реакции или смешанные Th1/Th2 реакции на MAGE-6 пептиды [25]. Процент IFN- $\gamma$ -продуцирующих клеток значительно ниже у пациентов с меланомой независимо от стадии, чем у здоровых доноров [6; 20]. Стимулирование экспрессии интерлейкинов Th1 профиля (таких как ИЛ-2 и IFN- $\gamma$ ) приводит к активации противоопухолевого клеточного иммунитета [17]. Показано, что наличие интерлейкинов Th1 в зоне опухолевого роста предотвращает прогрессию болезни и приводит к регрессу, в то время как инвазия Th2-опосредованными клетками увеличивает потенциал для метастазирования. Снижение в системном иммунном ответе может быть связано с синтезом опухолевыми клетками цитокинов-иммуносупрессоров (ИЛ-10, TGF- $\beta$ , VEGF) и экспрессией на поверхности опухолевых клеток молекул FAS-L [21]. У пациентов с прогрессирующей меланомой циркулирующий профиль цитокинов отражает Th2-иммунные реакции, в то время как пациенты, отвечающие на терапию, имеют профиль Th1 [15]. Предполагается, что тактика лечения, направленная на активацию и поддержку Th1 иммунного ответа, может иметь лучшую клиническую эффективность в отношении стабилизации и предотвращения опухолевого роста [22]. Существует гипотеза: в основе противоопухолевого иммунного ответа лежит реакция T-клеточного опосредованного иммунного ответа [29]. Результаты многочисленных исследований поддерживают гипотезу о том, что можно вызвать регресс меланомы путем секреции цитокинов Th1 профиля активированными CD4<sup>+</sup> T-лимфоцитами [11]. В некоторых работах показана корреляция между цитокинами Th1-профиля и случаями спонтанного регрессирования меланомы [27]. Однако достоверно не доказано, что подобные изменения иммунологического профиля вызывают регресс заболевания.

Цель настоящего исследования – изучение изменения относительного содержания сывороточного уровня интерлейкина-2 (ИЛ-2) у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинации аутологичными дендритными клетками. Изучение изменения уровня цитокинов в ходе вакцинации у больных диссеминированной меланомой позволит использовать их в качестве одного из критериев иммунологической эффективности противоопухолевой вакцинации [3; 9; 10; 28].

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы сывороток крови больных диссеминированной меланомой (n=48), полученные до начала вак-

цинации аутологичными дендритными клетками и после 5 введения вакцины (интервалы между вакцинациями – 1 мес.). В качестве контроля использовались образцы сывороток крови здоровых доноров (n=102).

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), нагруженных аутологичным опухолевым лизатом. Определение сывороточного уровня ИЛ-2 проводилось иммуноферментным методом с использованием диагностической тест-системы Bender MedSystems (Австрия). Учет результатов проводился спектрофотометрически при  $\lambda = 450$  нм.

Полученные результаты исследуемых показателей у пациентов анализировали относительно нормальных значений в группе здоровых доноров (контроль). Сывороточный уровень (СУ) ИЛ-2 рассчитывали по формуле:

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

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием методов описательной статистики. Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Расчет выживаемости проводили методом Каплана–Майер. Сравнение двух кривых выживаемости проводили с помощью логранкового критерия. Проведение статистического анализа данных проводилось с помощью пакета программ EXCEL 2003, STATISTICA 6.0 и SPSS 17.0.

### Результаты и обсуждение

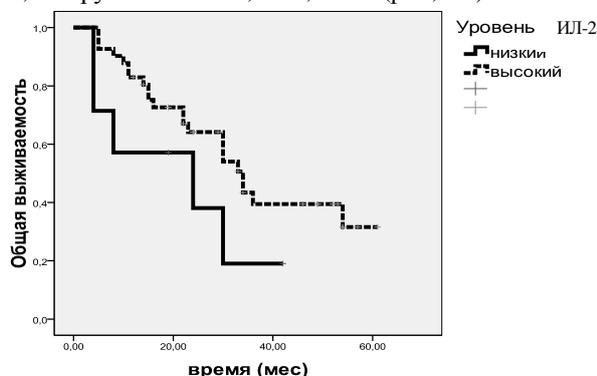
Перед началом вакцинации среднее значение уровня ИЛ-2 в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой (n=48) составляло  $18,10 \pm 12,30$  пкг/мл и в ходе лечения повысилось до  $21,33 \pm 24,79$  пкг/мл. Среднее значение ИЛ-2 в контрольной группе здоровых доноров (n=102) составило  $5,53 \pm 3,73$  пкг/мл.

Однако значения сывороточного содержания исследуемого антигена у всех пациентов (n=48) колебались от 0,53 до 55,74 пкг/мл. Мы проанализировали полученные результаты и перевели их в относительные, в зависимости от нормы (контроль).

В зависимости от исходного уровня относительного содержания ИЛ-2 в образцах сыворотки крови всех пациентов (n=48) относительно контроля больные были разделены на 2 группы. Группу №1 составили пациенты с изначально повышенным относительным содержанием исследуемого цитокина в сыворотке крови, а группу №2 – больные с пониженным содержанием уровня ИЛ-2 относительно средних значений данного маркера в сыворотке крови здоровых доноров (см. табл.).

Анализ сывороточного содержания ИЛ-2 выявил, что исходный уровень относительного содержания данного маркера в сыворотке крови пациентов группы №1 (n=41) был достоверно повышен в 3,7 раза по сравнению с контрольной группой здоровых доноров и в ходе лечения повысился в 4,4 раза относительно показателей в контрольной группе. В образцах сыворотки крови больных группы №2 (n=7) исходный уровень относительного содержания ИЛ-2 был достоверно снижен в 1,9 раза относительно показателей в контрольной группе здоровых доноров.

В ходе лечения отмечена тенденция к понижению исследуемого маркера (ИЛ-2) у пациентов группы №2. Был проведен анализ выживаемости пациентов в двух группах больных, распределенных в зависимости от начального уровня ИЛ-2 (см. рис.). Медиана выживаемости в группе № 1 составила 34,0±4,6 мес., а в группе № 2 – 24,0±16,7 мес. (p=0,131).



**Рис.** Выживаемость больных диссеминированной меланомой в зависимости от начального уровня ИЛ-2 в сыворотке крови в группах №1 и №2.

### Заключение

Исследовано относительное содержание ИЛ-2 у больных диссеминированной меланомой в ходе вакцинации аутологичными дендритными клетками.

На основании полученных данных было установлено, что при аутологичной вакцинации у большинства пациентов (85,4 % больных) наблюдается повышение уровня относительного содержания ИЛ-2 (Th1-тип цитокинов), которое свидетельствует об активации клеточного звена противоопухолевого иммунитета в ходе лечения.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Москвы в рамках научно-технической программы «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения онкологических и других заболеваний», а также при поддержке Совета по грантам Президента РФ «НШ – 3482.2010.7»*

Таблица

Относительное содержание ИЛ-2 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинации аутологичными дендритными клетками (M±m), %

Группы	Среднее содержание ИЛ-2 (%)	
	До лечения	После лечения
Все пациенты (n=48)	327,34±222,46*	385,73±448,20*
1. Группа №1 (n= 41); (повышены значения ИЛ-2)	374,19±206,30* **	443,39±460,99* **
2. Группа №2 (n= 7); (понижены значения ИЛ-2)	52,90±32,29* **	48,02±32,83* **
3. Контрольная группа здоровых доноров (n= 102)	100,02±67,51*	–

\*статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой (p<0,05);  
\*\*статистически достоверные различия между группами №1 и №2 (p < 0,05).

### Литература

1. Барышников А.Ю. Биотерапия опухолей: неудачи и перспективы // Маммология. – 2007. – №1. – С. 13–6.
2. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – Т. 1. – С. 6–10.
3. Михайлова И.Н., Парсункова К.А., Есеевеева И.В. и др. Динамика цитокинов у больных с диссеминированной меланомой в ходе вакцинации аутологичными дендритными клетками // Иммунология. – 2010. – №3. – С. 131–5.
4. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Демидов Л.В. Вакцинация меланомы дендритными клетками // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 8–18.
5. Моисеев В.М., Балдуева И.А. Проблемы иммунологии опухолевого роста и возможности вакцинации // Медицинский академический журнал. – 2007. – Т.7, №4. – С. 17–35.
6. Botella-Estrada R., Escudero M., O'Connor J.E. et al. Cytokine production by peripheral lymphocytes in melanoma // Eur Cytokine Netw. – 2005. – 16(1). – P. 47–55.
7. Brady M.S., Eckels D.D., Lee F. et al. Cytokine production by CD4+ T-cells responding to antigen presentation by melanoma cells // Melanoma Res. – 1999. – 9(2). – P. 173–80.
8. Green D.S., Dagleish A.G., Belonwu N. et al. Topical imiquimod and intralesional interleukin-2 increase activated lymphocytes and restore the Th1/Th2 balance in patients with metastatic melanoma // Br J Dermatol. – 2008. – 159(3). – P. 606–14.
9. Hersey P., Menzies S.W., Halliday G.M. et al. Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients: with disseminated melanoma // Cancer Immunol Immunother. – 2004. – 53(2). – P. 125–34.
10. Lauerova L., Dusek L., Simickova M. et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response // Neoplasma. – 2002. – 49(3). – P. 159–66.
11. Lowes M.A., Bishop G.A., Crotty K. et al. T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas // J Invest Dermatol. – 1997. – 108(6). – P. 914–9.
12. Machlenkin A., Goldberger O., Tirosh B. et al. Combined dendritic cell cryotherapy of tumor induces systemic antimetastatic immunity // Clin Cancer Res. – 2005. – 11(13). – 4955–61.
13. Mansfield A.S., Holtan S.G., Grotz T.E. et al. Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis // Mod Pathol. – 2011. – 24(4). – P. 487–94.
14. Martínez-Escribano J.A., Campillo J.A., Piñero A. et al. Prospective study of the levels of serum cytokines in patients with melanoma: prognostic value // Actas Dermosifiliogr. – 2005. – 96(2). – P. 83–91.

15. *McCarter M., Clarke J., Richter D., Wilson C.* Melanoma skews dendritic cells to facilitate a T helper 2 profile // *Surgery*. – 2005. – 138(2). – P. 321–8.
16. *Minkis K., Kavanagh D.G., Alter G. et al.* Type 2 Bias of T cells expanded from the blood of melanoma patients switched to type 1 by IL-12p70 mRNA-transfected dendritic cells // *Cancer Res*. – 2008. – 68(22). – P. 9441–50.
17. *Missima F., Pagliarone A.C., Orsatti C.L. et al.* The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress // *Phytother Res*. – 2010. – 24(10). – P. 1501–7.
18. *Nakai N., Katoh N., Germeraad W.T. et al.* Immunohistological analysis of peptide-induced delayed-type hypersensitivity in advanced melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination // *J Dermatol Sci*. – 2009. – 53(1). – P. 40–7.
19. *Nevala W.K., Vachon C.M., Leontovich A.A. et al.* Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma // *Clin Cancer Res*. – 2009. – 15(6). – P. 1931–9.
20. *Rankin E.B., Yu D., Jiang J. et al.* An essential role of Th1 responses and interferon gamma in infection-mediated suppression of neoplastic growth // *Cancer Biol Ther*. – 2003. – 2(6). – P. 687–93.
21. *Redondo P.* Update on melanoma: incidence, development and biological aspects // *An Sist Sanit Navar*. – 2000. – 23(1). – P. 67–84.
22. *Sasaki K., Pardee A.D., Qu Y. et al.* IL-4 suppresses very late antigen-4 expression which is required for therapeutic Th1 T-cell trafficking into tumors // *J Immunother*. – 2009. – 32(8). – P. 793–802.
23. *Sato T., Maguire H.C. Jr., Mastrangelo M.J., Berd D.* Human immune response to DNP-modified autologous cells after treatment with a DNP-conjugated melanoma vaccine // *Clin Immunol Immunopathol*. – 1995. – 74(1). – P. 35–43.
24. *Schaefer J.T., Patterson J.W., Deacon D.H. et al.* Dynamic changes in cellular infiltrates with repeated cutaneous vaccination: a histologic and immunophenotypic analysis // *J Transl Med*. – 2010. – 8. – P. 79.
25. *Tatsumi T., Kierstead L.S., Ranieri E. et al.* Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma // *J Exp Med*. – 2002. – 196(5). – P. 619–28.
26. *Verdegaal E.M., Visser M., Ramwadhoebe T.H. et al.* Successful treatment of metastatic melanoma by adoptive transfer of blood-derived polyclonal tumor-specific CD4+ and CD8+ T cells in combination with low-dose interferon-alpha // *Cancer Immunol Immunother*. – 2011 Mar. – Epub ahead a print.
27. *Wagner S.N., Schultewolter T., Wagner C. et al.* Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression // *Lab Invest*. – 1998. – 78(5). – P. 541–50.
28. *Willemsen R.A., Sebestyén Z., Ronteltap C. et al.* CD8 alpha coreceptor to improve TCR gene transfer to treat melanoma: down-regulation of tumor-specific production of IL-4, IL-5, and IL-10 // *J Immunol*. – 2006. – 177(2). – P. 991–8.
29. *Winter H., Hu H.M., Poehlein C.H. et al.* Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies // *Immunology*. – 2003. – 108(3). – P. 409–19.
30. *Wong R., Lau R., Chang J. et al.* Immune responses to a class II helper peptide epitope in patients with stage III/IV resected melanoma // *Clin Cancer Res*. – 2004. – 10(15). – P. 5004–13.

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



## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006:575.117.2:577.113.3

*А.М. Дейчман*

### О ВОЗМОЖНЫХ НОВЫХ МЕХАНИЗМАХ ОБРАЗОВАНИЯ КОРОТКИХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОМА РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

**Контактная информация:***Дейчман Александр Маркусович, ведущий инженер лаборатории НИИ ЭДнТО*

Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)612-89-25

E-mail: [amdeich@rambler.ru](mailto:amdeich@rambler.ru)

Статья поступила: 27.04.2011, принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

Рассмотрен гипотетический вариабельный механизм образования коротких олигонуклеотидных последовательностей, направляемый белковым эпитопом как матрицей (псевдоматрицей). Предполагается, что эпитоп может ориентировать набор соответствующих аминокислотированных транспортных РНК (Аа-тРНК), сближенные антикодонные участки которых копируются (или последовательно вырезаются/сшиваются) и служат основой для образования коротких нуклеиновых последовательностей (нуклеиновых эквивалентов эпитопов, НЭ), используемых клеткой для различных целей (защитных, регуляторных, эволюционных). Предложенный механизм представляется подобным, но не тождественным т.н. гипотетическому механизму «обратной трансляции» (M. Nashimoto, 2001), при котором соответствие между аминокислотой и всеми тремя нуклеотидами исходно кодирующего её кодона жестко детерминированы. Рассматривается возможность участия НЭ в процессах геномной изменчивости, а также в функционировании генома, принимая во внимание существование механизмов (РНК-интерференция), оперирующих с короткими РНК, а также недавно обнаруженные способы защиты бактериальных геномов от чужеродной ДНК, основанные на образовании коротких олигорибонуклеотидов.

**Ключевые слова:** геном; экспрессия генов; эпитоп; нуклеиновый эквивалент эпитопа.*A.M. Deichman*

### ABOUT POSSIBLE NEW MECHANISMS OF FORMATION THE SHORT NUCLEOTIDE SEQUENCES, PARTICIPATING IN REGULATION GENOME EXPRESSION N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

**Abstract**

The hypothetical variable mechanism of short oligonucleotide sequences formation on protein's epitope as a matrix (pseudomatrix) is considered. It is supposed, that epitope can focus a set corresponding aminoacylating transport RNAs (Aa-tRNAs), juxtapose together with anticodone sites which are copied (or consecutive cut out/sew) form a basis for formation of short nucleic sequences (nucleic equivalents epitope, NE). Cells use these sequences for the various purposes (protective, regulatory, evolutionary). The suggested mechanism is similar, but not identical to so-called hypothetical mechanism «reverse translation» (M. Nashimoto, 2001): according to this hypothesis, conformity between amino acid and all three nucleotides initially coding of codone is rigidly determined. It is considered an opportunity of participation NE in processes genome variability, and also in functioning genome, considering existence of mechanisms of the RNA-interference, operating with short RNAs, and also recently found out ways of protection bacterial genomes from alien DNA, based on formation short oligoribonucleotides.

**Keywords:** genome, expression genes, epioppe, nucleic equivalent epioppe.**Введение**

Выявление в последние годы так называемых коротких РНК (21–30 нуклеотидов) продемонстрировало неожиданные и непредсказуемые возможности новых способов контроля экспрессии генов и стабильности генома эукариот. Выявлены три основных типа коротких РНК: микро-РНК [35; 45], эндогенные малые интерферирующие РНК, или siRNA [30; 33] и piRNA, связываемые так называемыми Piwi белками [31]. Все эти типы РНК участвуют в регуляции экспрессии генов, а siРНК и

piРНК направлены также на подавление экспрессии транспозонов и обеспечение стабилизации геномов. Уже совсем недавно была обнаружена защитная роль коротких РНК (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats RNAs, или crRNAs) у прокариот [21; 34].

Поэтому представляет интерес рассмотреть возможности существования других, сейчас, казалось бы, невероятных, способов возникновения в клетке коротких олигорибонуклеотидов, которые могут быть использованы для аналогичных регуляторных или защитных целей.

Учитывая революцию в понимании механизмов регуляции экспрессии генов, основанную на обнаружении функций коротких РНК, представляет интерес реанимировать рассмотрение вопроса о так называемой «обратной трансляции» («*reverse translation*»), т.е. о возможности синтеза олигонуклеотидных последовательностей на коротких олигопептидных матрицах.

Такие попытки уже предпринимались японским исследователем М. Нашимото [37], предложившим гипотетический гТ-механизм (от «*reverse translation*») обратной трансляции небольшого, т.н. «примитивного» белка за счет перенесения (переписывания) заключенной в белковом эпитопе (олигопептиде) информации на язык нуклеотидов [37]. М. Нашимото получил с помощью T7 полимеразы (*in vitro*) 83-нуклеотидную последовательность РНК с характерной структурой «головки молотка» (*hammerhead*; [12; 50]), содержащую несколько элементов петля/стебель. Эта последовательность обладала рибозимной эндонуклеазной активностью и содержала аргининсвязывающий домен – встроенный аптамерный конструктор, полученный ранее G.J. Connell et al. [24] (рис. 1А; показан овалом с Arg внутри). Взаимодействуя с аргинином (за счет водородных и других связей) [16], Arg-связывающий домен мог направлять рибозимопосредуемое самонадрезание 3'-концевого кодона данной аминокислоты. Такая структура была названа автором  $rtRNA^{Arg}$  (от «*reverse translation RNA*»). В присутствии T4 РНК-лигазы концевой кодон  $rtRNA^{Arg}$  присоединялся к другой РНК, которая комплементарно взаимодействовала с восемью нуклеотидами свободного 5'-конца  $rtRNA^{Arg}$  с образованием 91-нуклеотидной последовательности (рис. 1Б); далее 3'-концевая 11-нуклеотидная последовательность  $rtRNA^{Arg}$  (при 50 °С, 10 mM  $MgCl_2$ ) выщеплялась из 91-нуклеотидной структуры с помощью эндонуклеазной рибозимной активности с образованием 80-нуклеотидной последовательности (рис. 1В). Отщепленная РНК была названа М. Нашимото пре-мРНК, т.к. она, согласно его предположениям, могла наращиваться в результате аналогичных актов присоединения концевых кодонов от нескольких  $rtRNAs$ , каждая из которых имела домен связывания с конкретной аминокислотой олигопептида (эпитопа) и 5'-концевую последовательность (из нескольких нуклеотидов), комплементарную пре-мРНК [37]. Заметим, что используемая в эксперименте пре-мРНК (рис. 1) отличалась от структуры, предложенной автором в приведенной им схеме (рис. 2), иллюстрирующей механизм обратной трансляции.

Гипотетический механизм процесса по М. Нашимото состоял из нескольких этапов: в поочередном ковалентном связывании каждой С-концевой аминокислоты (в данном случае – аргинина) «обратно транслируемого» олигопептида («примитивного белка» Met–Val–...–Phe–Ile–Arg) с якорным CCA-концом пре-мРНК (рис. 2А-Б); затем 5'-GGU конец  $rtRNA$  (здесь  $rtRNA^{Arg}$ ) комплементарно связывался с CCA-концом пре-мРНК (три-нуклеотидные пары могли быть и другими, но выбор CCA-конца подчеркивает эволюционную связь  $rtRNA^{Arg}$  с тРНК); одновременно домен связывания с определенной аминокислотой в  $rtRNA$  (аптамерный конструктор внутри  $rtRNA^{Arg}$ ) связывался только с концевой аминокислотой олигопептида (рис. 2В); на следующей стадии 3'-концевой кодон  $rtRNA^{Arg}$  лигировал со стоп кодонами UAG, UGA на 3'-конце будущей мРНК (рис. 2Г); далее рибозимная

самонадрезающая активность  $rtRNA^{Arg}$  отщепляла 3'-концевой кодон аргинина от  $rtRNA^{Arg}$ , оставляя его связанным со стоп-кодонами пре-мРНК (внутри Stop<sup>UGA</sup>-Stop<sup>UAG</sup>-CCA структуры), а  $rtRNA^{Arg}$  захватывала концевой аргинин олигопептида своим аргининсвязывающим доменом и покидала активный сайт (рис. 2Д); такой цикл повторялся в отношении каждой из последующих концевых аминокислот (Ile и др.; рис. 2, Е; Ж), что вело к образованию последовательности кодонов аминокислот исходного обратно транслируемого олигопептида в составе олигонуклеотида (рис. 2З). Заметим, что изображенная на рис. 1 схема отражает результат, полученный М. Нашимото непосредственно в эксперименте [37], тогда как постадийный механизм процесса обратной трансляции – целиком гипотетический (рис. 2), за исключением реакции рибозимного самонадрезания и лигирования 3'-концевого кодона (часть рис. 2Д).

Согласно гипотезе М. Нашимото [37], когда могла существовать «двусторонняя симметрия» между процессами трансляции, т.е. стандартного образования олигопептида на РНК-матрице (РНК→белок), и т.н. «обратной трансляцией» (белок→РНК, собственно «*reverse translation*»), когда для образования РНК была необходима олигопептидная матрица. Такая симметрия по мнению М. Нашимото [37] с окончательным формированием трансляционного, транскрипционного и репликационного аппаратов клетки, исчезла вместе с аппаратом «обратной трансляции». Однако в сильно редуцированном виде механизм поддержания «РНК/белковой симметрии» мог сохраниться.

#### **Гипотетический механизм вариабельной поэптонной обратной трансляции**

Предлагаемый вариант гипотетического механизма сходен, но не тождественен механизму описанной выше «обратной трансляции». Известно, что в митохондриях (органеллах) эукариотических клеток сохраняются достаточно древние механизмы, которые могут лежать в основе эволюции молекул РНК: например, здесь функционируют интроны группы II и реакции обратного сплайсинга (ретроинтроны), ответственные за включение интрона или его фрагмента в состав мРНК [32]. К настоящему времени ретроинтроны обнаружены в небольшом количестве и только для геномов некоторых зубобактерий и органелл (в основном – митохондрий грибов и пластид растений; [17]). Обнаружение необычных химических реакций в митохондриях (органеллах), например различных видов редактирования РНК [43], позволяет рассматривать исследование функционирования их геномов как источник пополнения «археологической летописи» тех событий (начиная с т.н. эпохи RNA-world [36]), которые связаны с изменчивостью РНК. В составе внутренних мембран органелл (хлоропластов, митохондрий) обнаруживаются тРНК, неотделимые от мембран даже в жестких условиях лизиса (в присутствии тритона X-100, др. детергентов; [10]). Роль сложноорганизованных двойных мембран органелл, содержащих изменчивые гликолипопротеидные компоненты, представляется неслучайной. Именно с их участием оказываются возможными синтез белка в мембраносвязанных фракциях рибосом и тонкие ансамблевые взаимодействия расположенных на них молекул. Можно допустить, что наборы транспортных РНК (Aa-тРНК) удерживаются внутренней мембраной органелл, возможно между ее двумя двойными мембранами.

Каждая из мембран имеет толщину до 75 Å и межмембранную щель до 100 Å [1]. Этого достаточно для функционирования в примембранном/межмембранном пространстве L-образных Аа-тРНК, оба стебля которых достигают 70 Å [3]. Необходимые полимеразная, экзо-/эндонуклеазные, лигазная и другие активности присутствуют в качестве компонент репликативного, транскрипционного, трансляционного аппаратов, ферментов редактирования РНК этих органелл, а также других белков и ферментов органелл и ядра/цитоплазмы [7].

Фрагмент белка, участвующий в обратной трансляции, может быть представлен эпитопом, включающим 5–10 аминокислот (минимальная длина, значимая в большинстве иммунологических, биохимических и молекулярно-биологических исследованиях), и локализованным на внутренней, труднопроницаемой даже для малых ионов, мембране митохондрии или хлоропласта. Предполагается, что аминокислоты мембран-локализованного эпитопа одна за другой выщепляются протеазами и аминоацилируют соответствующую тРНК (рис. 3, А). Аминоацилирование ССА-конца тРНК может происходить при участии кодируемой в ядре и поступающей из цитоплазмы специфической митохондриальной аминоксил-тРНК-синтетазы, например, лизил-тРНК-синтетазы человека [5]. Этот фермент (как и предшественник специфической митохондриальной метилазы растений) также способен быть одним из факторов переноса некоторых цитоплазматических тРНК через митохондриальную мембрану [5]. Кроме того, дополнительным фактором, облегчающим аминоацилирование, может быть то, что элонгация эукариотических тРНК (с участием тРНК-нуклеотидилтрансферазы) сопровождается у разных видов варьированием длины ССА-конца (на 3–6 нуклеотидов) и спектра дополнительно включаемых нуклеотидов (СМР > АМР > УМР > ГМР) [39]. Это может способствовать преодолению возможных стерических затруднений, связанных с аминоацилированием тРНК на мембране митохондрий.

Во втором случае выщепляемые протеазами аминокислоты мембран-локализованного эпитопа, поочередно сближаясь с каждой из аминокислот Аа-тРНК, способствуют ориентации вблизи себя определенного набора Аа-тРНК – за счет парных взаимодействий аминокислот эпитопа и Аа-тРНК (рис. 3Б). Пары аминокислот, известно, часто формируют сочетания различных типов белок-белковых (водородных, гидрофобных, ионных, ван-дер-ваальсовых, др.) взаимодействий [15; 46].

На рис. 3А показан вариант «переписывания» отдельного белкового эпитопа на антикодоновых участках набора тРНК. Эти участки L-образных тРНК, прочно локализованных на внутренней мембране (указана замкнутой кривой пунктирной линией) митохондрий (хлоропластов), в определенный момент оказываются достаточно сближенными, чтобы использоваться полимеразой в качестве матрицы, на которой далее образуется НЭ эпитопа. На рис. 3Б показано то же самое с участием Аа-тРНК. Число близко расположенных в одну стопку L-образных тРНК (Аа-тРНК) на внутренней мембране органеллы соответствует числу аминокислот эпитопа. В составе тРНК нуклеотиды антикодона образуют спиральную структуру вне основной свернутой молекулы [3]. Поскольку органеллы «дышат», меняя конфигурацию своих мембран, наступает момент, когда антикодоновые участки разных L-образных тРНК (Аа-тРНК) оказыва-

ются сближенными, что и является сигналом для РНК-полимеразной (см. рис. 3А-Б) или последовательного действия эндонуклеазной и лигазной (без рисунка) активностей с последующим образованием НЭ эпитопа. Полимеразная активность может осуществляться со значительно большими, чем в случае стандартных матриц, паузами.

Заметим, что для варианта механизма, допускающего последовательные вырезание и сшивку антикодоновых участков (и при участии эндонуклеазной и лигазной активностей), ближайшим аналогом является механизм вставок/делений уридин при редактировании пре-мРНК кинетоластов (митохондрий) трипаносом с участием гидовых РНК (gRNAs; [47]).

Другой аналог – описанная реакция обратного сплайсинга (в частности для самосплайсирующихся интронов группы II [17; 41; 54]), заключающаяся в inserции олигонуклеотида внутрь другой молекулы РНК. В любом случае для эпитопа в 5–10 аминокислот (и столько же триплетов) может сформироваться нуклеиновый эквивалент, включающий 15–30 нуклеотидов.

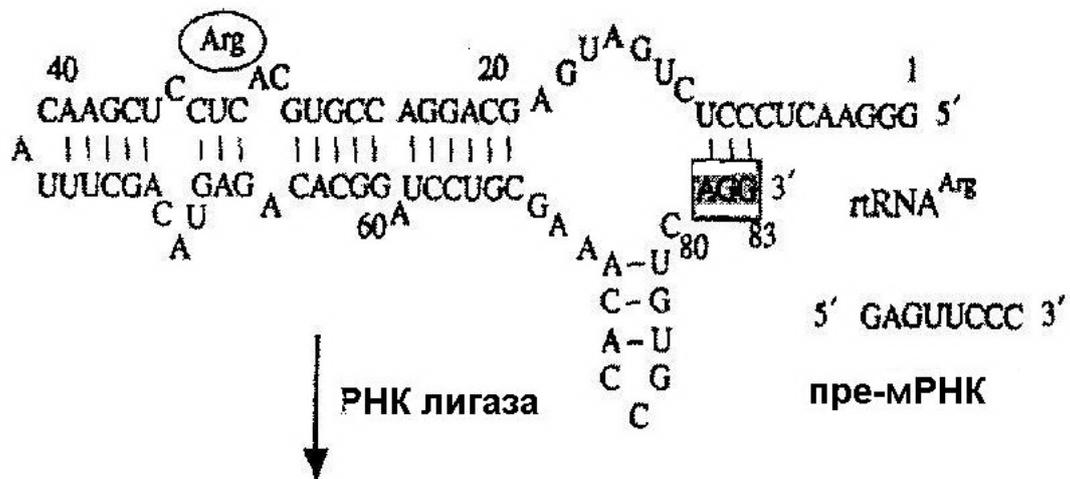
Образовавшийся НЭ может использоваться клеткой для осуществления защитной и регуляторной функций, а также как инструмент эволюционной изменчивости при перенесении его копий в разные участки генома.

Можно предположить, что функционирование известных коротких (20–30 нуклеотидов) РНК и их воздействие на мРНК-мишени [13] подвержены регулированию за счет комплементарных взаимодействий с олигонуклеотидами НЭ. Короткие 20–30-нуклеотидные РНК, как известно, контролируют экспрессию значительной части генов (белков, др.) [6; 27; 38]. Длина гипотетически ретранслируемых с белкового эпитопа нуклеотидных отрезков (~15–30 нуклеотидов) соответствует размеру зрелых коротких РНК, а также длине т.н. редактируемых кассет (14–29 нуклеотидов) внутри фрагментов мРНК/пре-мРНК митохондрий [52], ядра [14], хлоропластов [23] (при различных видах редактирования РНК *in vitro*), и информационного участка в составе направляющих редактирование «гидовых»-РНК (gRNAs), направляющих U-делеции/вставки в пре-мРНК кинетоластов трипаносом. Предлагаемый механизм воспроизводства НЭ может связывать работу ядерного и митохондриального геномов, т.е. быть источником периодического пополнения такими отрезками ядерного и митохондриального геномов.

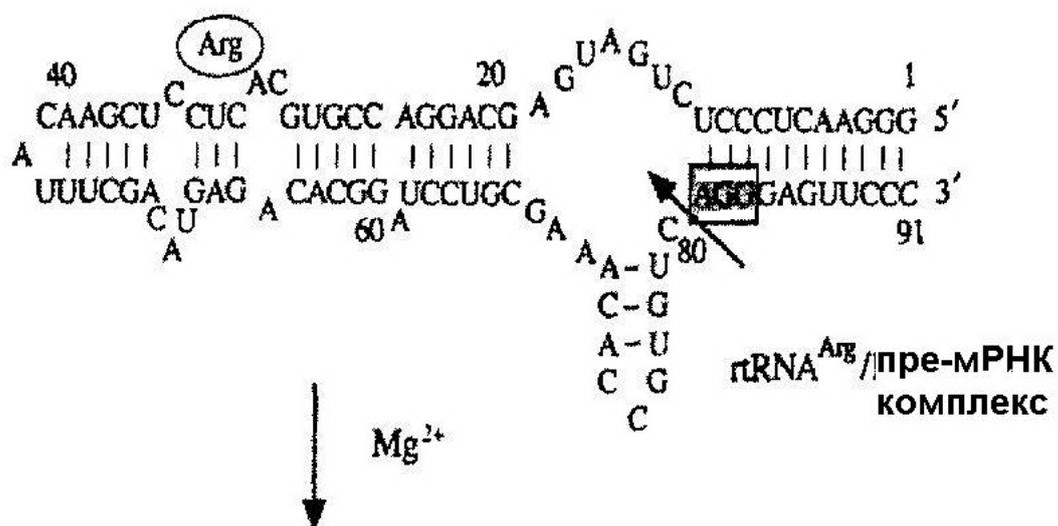
Необходимо учесть, что каждая аминокислота эпитопа может соединиться не только с одной именной тРНК (см. рис. 3А [9]), и не с одним вариантом Аа-тРНК при парном взаимодействии аминокислот эпитопа и Аа-тРНК (см. рис. 3Б). Ошибки (1) при аминоацилировании (связанные, в частности, с РНК-редактированием антикодона тРНК и/или фермента Аа-тРНК-синтетазы [42]; см. рис. 3А), и отсутствие жестко комплементарных взаимодействий (2) между отдельными аминокислотами (см. рис. 3Б), обычно характерных для уотсон-криковских пар нуклеотидов, может быть источником вариативности образуемых НЭ.

В состав тРНК, включая участок антикодона, входят и нестандартные нуклеотиды, например псевдоуридин, который в первом положении антикодона некоторых митохондриальных тРНК позволяет декодировать несколько антикомплемментарно взаимодействующих с ним кодонов одной аминокислоты [6].

(a)



(б)



(в)

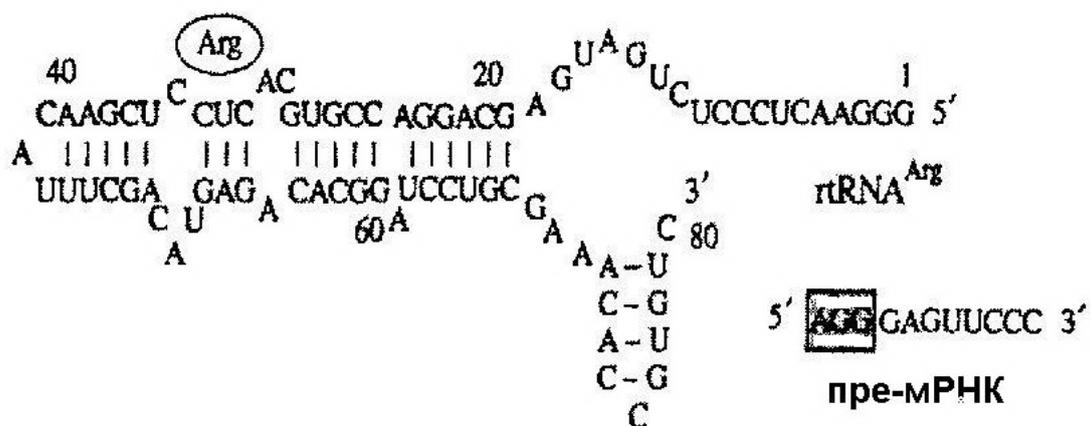
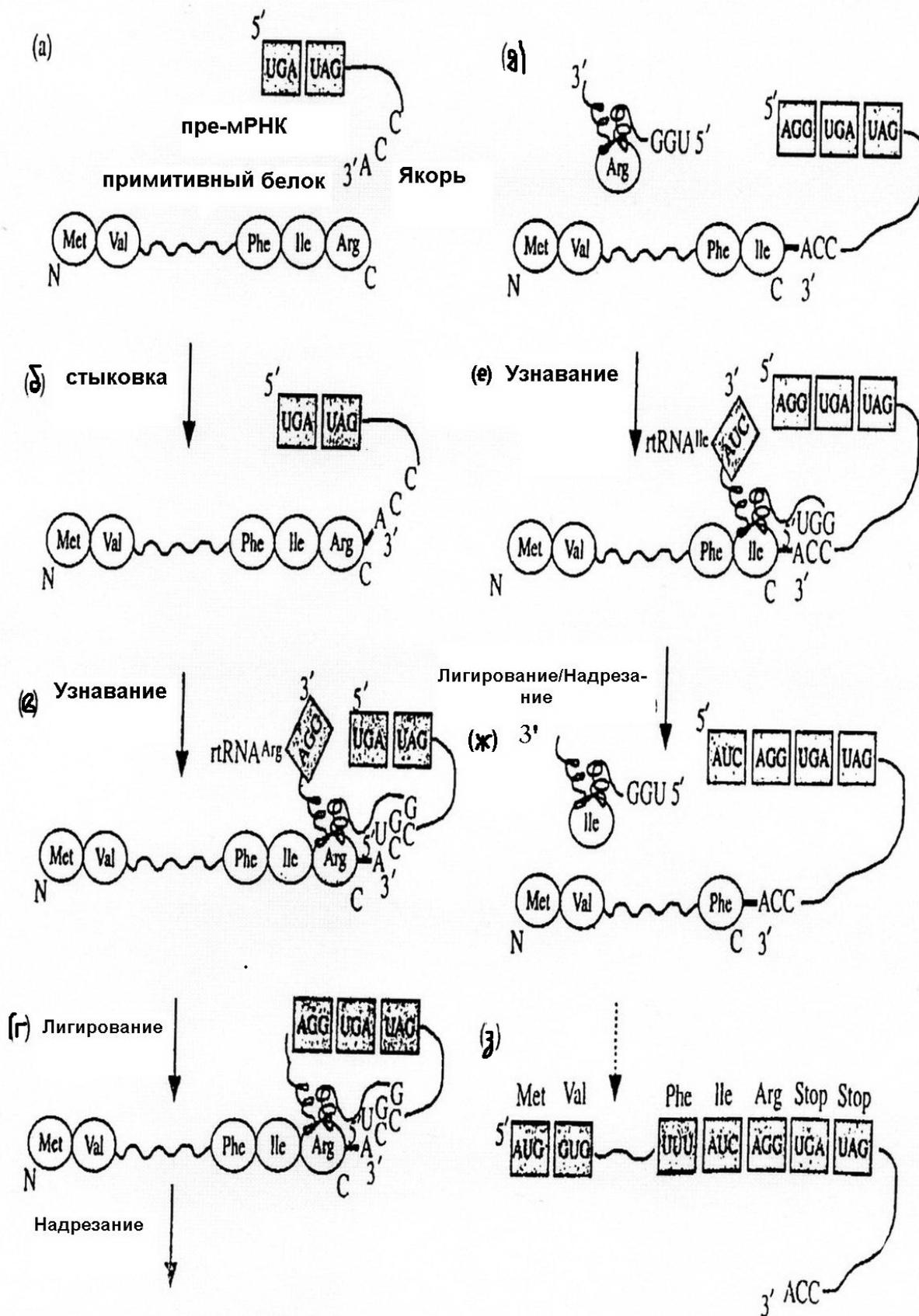
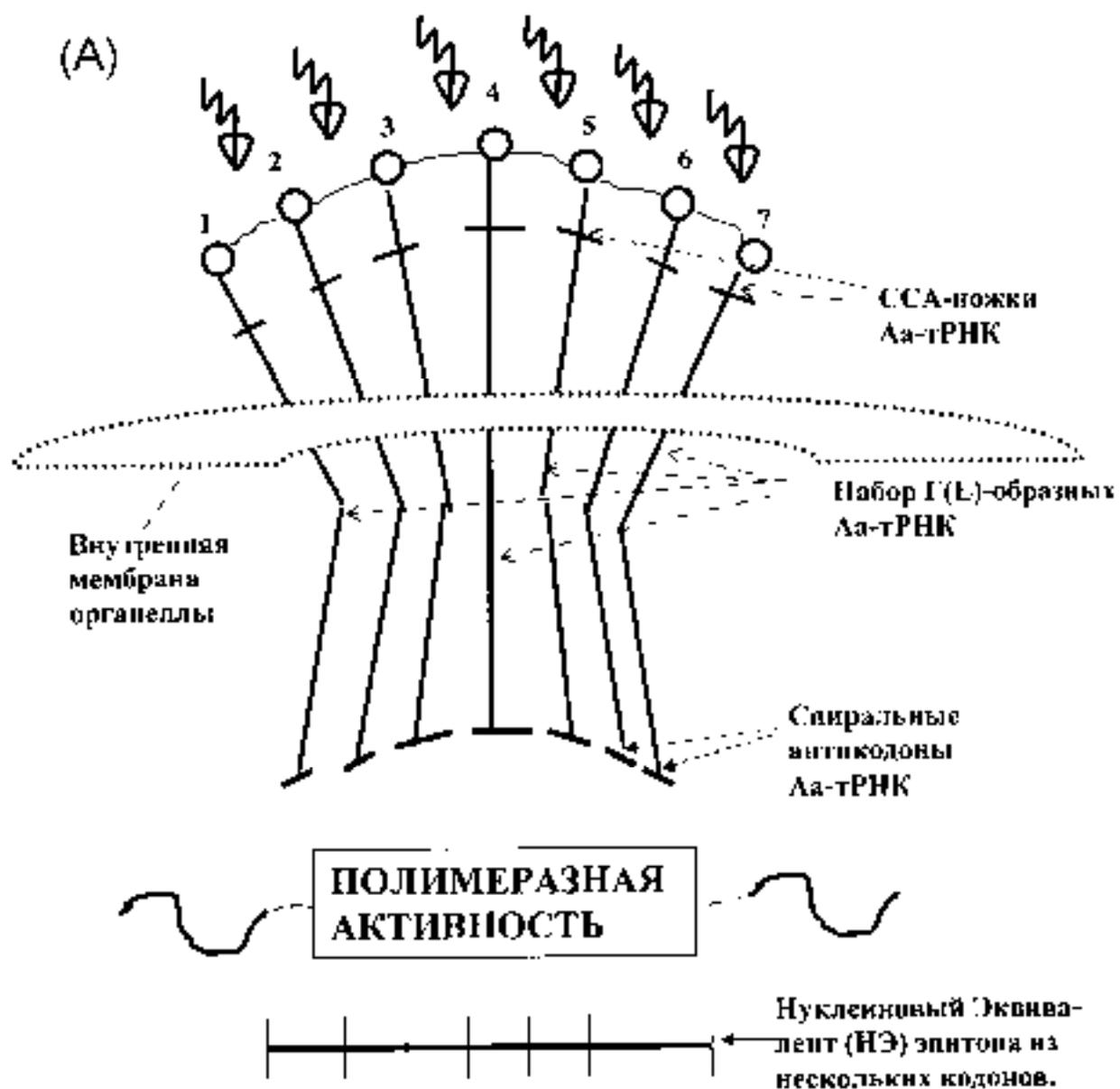


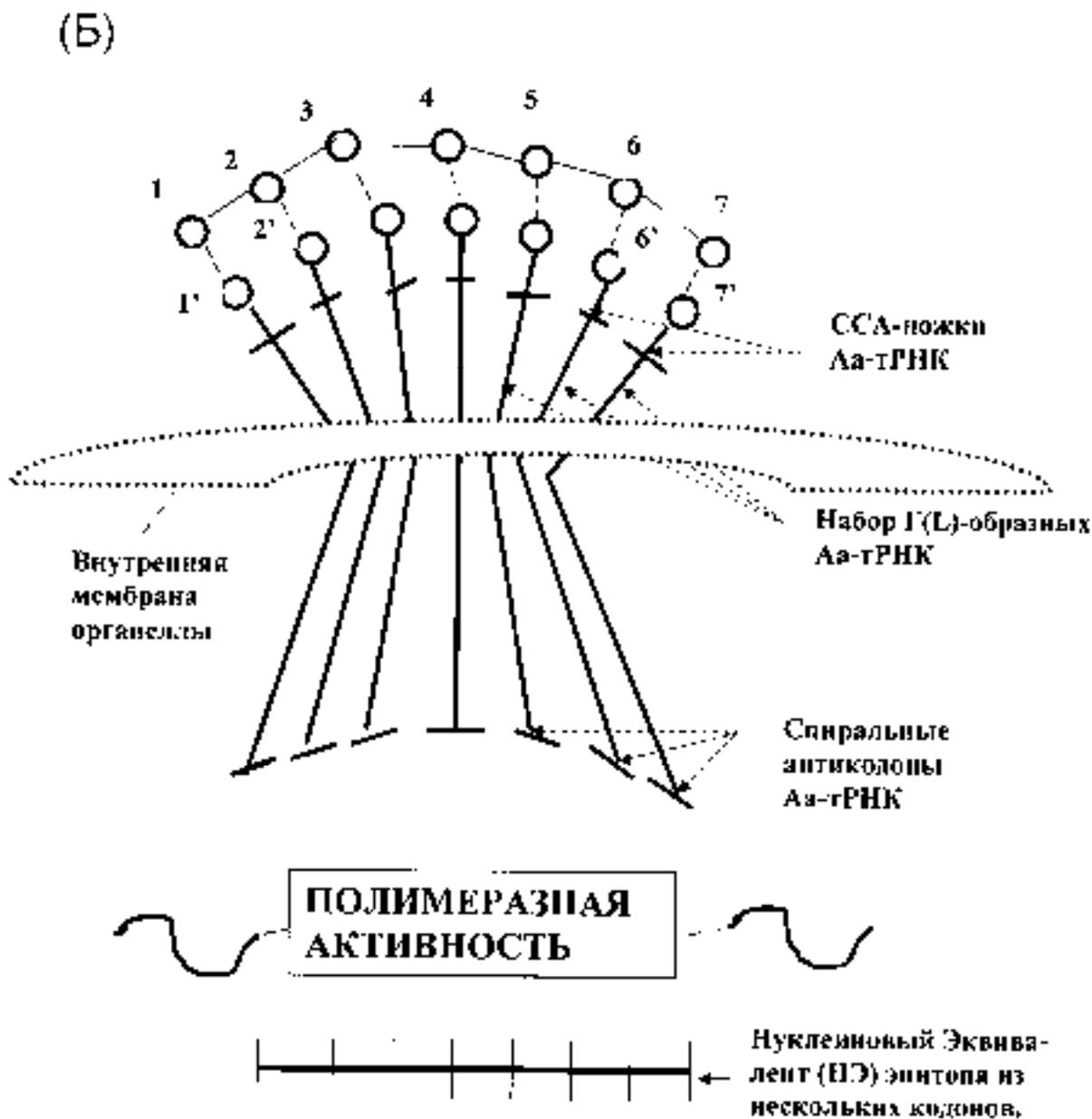
Рис.1. Основные шаги обратной трансляции по М. Нашимомто [37].

А-В: Прямоугольники и стрелка показывают, соответственно, аргининовый кодон и сайт надреза в hammerhead-рибозиме. Аргинин способен связываться с tRNA<sup>Arg</sup> (показан овалом с Arg внутри) (с любезного разрешения М. Нашимомто).



**Рис. 2** Модель гипотетического гТ-механизма по М.Нашимото [37]. Каждая аминокислота и каждый кодон обозначены (детали см. в тексте), соответственно, кружком или прямоугольником (с любезного разрешения М. Нашимото).





**Рис. 3.** Два варианта «переписывания» отдельного белкового эпитопа в его НЭ; наборы тРНК (А) и Аа-тРНК (Б) локализованы на внутренней мембране митохондрий.

А: переписывание происходит на сближенных антикодоновых участках набора L-образных тРНК, аминоацилируемых аминокислотами, выщепляемыми из эпитопа.

Б: переписывание происходит на сближенных антикодоновых участках набора исходно аминоацилированных L-образных Аа-тРНК.

1, 2, 3 ...7 – аминокислоты эпитопа;  $\Psi$  (стрелка в виде змейки) – место действия пептидазной активности (возможно, и для рис. Б); 1', 2', 3' ...7' – аминокислоты в составе Аа-тРНК.

Другой нестандартный нуклеотид, кьюозин (Q), образующийся в результате действия локализованной на поверхности митохондрий тРНК-гуанинтрансглицозилазы, может включаться в состав антикодоновых петель [18] цитоплазматических тРНК (некоторых эукариот и зубактерий). Присутствие нестандартных нуклеотидов – второй источник варибельности образуемых НЭ.

Набор митохондриальных тРНК резко снижен (у животных и грибов до 20–22, у высших растений до 27 тРНК) по сравнению с кодируемым в ядре цитоплазматическим набором тРНК (всего 37 генов тРНК, из них 32 – не амплифицированы; заметим, что в хлоропластах присутствует аналогичный цитоплазматическому набору генов тРНК; [7; 11]). Аминокислоты (за исключением метионина и триптофана) кодируются более чем одним кодоном (код вырожден); каждая аминокислота «обратно транслируемого» эпитопа может быть переписана в нуклеотиды другого своего кодона. Кроме того, как в случае лизил-тРНК-синтетазы человека [5], возможен перенос в митохондрии (или закрепление на мембране) цитоплазматических тРНК. Это третий источник варибельности образуемых НЭ.

Таким образом, НЭ белкового эпитопа может быть переписан неоднозначно, что обеспечивает варибельность НЭ.

Заметим, что при обратной транскрипции, обеспечиваемой одним ферментом, перечисленных источников варибельности при воспроизведении ДНК из РНК нет (за исключением случая, когда в РНК включается нестандартный нуклеотид, не редактируемый обратной транскриптазой, и ошибок самого фермента).

Различают линейные и конформационные эпитопы белков. Первые нарезаются различными протеазами/протеиназами клетки (протеасом, лизосом, фаголизосом).

Конформационные эпитопы как менее устойчивые могут быть предварительно фиксированы за счет образования белок-белковых (и других) сшивок, производимых различными ферментами (трансглутаминазой, лизил-оксидазой, др.), свободными радикалами и химически активными соединениями. При этом стабильность линеаризованных конформационных эпитопов, которые, как и линейные эпитопы, используются иммунной системой (при ответе), увеличивается.

Синтез различных вариантов нуклеиновых эквивалентов (НЭ) происходит с каждого отдельного эпитопа, поэтому описываемый гипотетический процесс назовем **варибельной Поэпитопной Обратной Трансляцией** (вПОТ). Регуляция последовательности реакций вПОТ-механизма может осуществляться в специальной мультиферментной частице – т.н. «ретранслосоме», включающей эпитоп, тРНК (Аа-тРНК) и необходимые ферментативные активности, обеспечиваемые белками (и, не исключено, рибозимами или ДНК-зимами).

Эта частица, предполагается, функционирует в связи с внутренней мембраной митохондрий/хлоропластов, с которой связана часть рибосом органелл. Сформированный НЭ может встроиться в РНК с помощью механизма, функционирующего при обратном сплайсинге [17; 54], и транспортироваться как внутри клетки, так и между клетками.

Также возможно связывание олигонуклеотида (НЭ) или более длинной нуклеиновой последовательности (с НЭ внутри) с белками с образованием транспортируемого нуклеопротеидного комплекса. Заметим, что аналоги внутри- и межклеточ-

ной передачи нуклеиновых последовательностей (РНК, ДНК) между ядром, цитоплазмой, митохондриями (внутри одного и между разными организмами) уже показаны: у бактерий, дрожжей (трансмембранный перенос плазмид) [1; 7]; трипаносом (транспорт цитоплазматических тРНК в митохондрии) [47]; насекомых (транспорт РНК через цитоплазматическую мембрану яйцеклетки) [6]; высших растений (транспорт плазмиды-ЦМС, цитоплазматической мужской стерильности, из митохондрии в ядро [11]); систем растения↔насекомые↔позвоночные (двунаправленный перенос РНК-вирусов) [2]. Для некоторых нуклеиновых кислот и вирусов показана высокая вероятность трансмембранного переноса через митохондриальные поры многоклеточных организмов в результате электроиндуцированного импульсного пробоя [4; 55].

Показана разная степень интенсивности естественного и экспериментального переноса тРНК через мембрану митохондрий у различных видов (простейших, дрожжей, высших растений, животных; [5]).

Вероятность существования механизмов гипотетической вПОТ (в митохондриях) и передачи нуклеиновых последовательностей между ДНК-содержащими клеточными органеллами усиливается в связи со следующими фактами:

1. Отдельные РНК-, ДНК- и смешанные РНК/ДНК-олигонуклеотиды способны многократно усиливать репарацию (гомологичной рекомбинацией или соединением негомологичных концов) двуниевых разрывов в хромосомальной ДНК дрожжей *S. cerevisiae* [49] (не прямо, а через кДНК-интермедиат этих олигонуклеотидов, опосредуемый активностью обратной транскриптазы цитоплазматических Ту-частиц);
2. Значительное число отдельных и несколько рядом расположенных рибонуклеотидов обнаружены в предварительно образующих РНК/ДНК-гибридные дуплексы тяжелой/основной (Н) и, главным образом, в легкой/отстающей (L) нитях реплицируемой (и, в меньшей степени, в нереплицируемой) митохондриальной ДНК млекопитающих (крысы, мыши, человека) [53];
3. Обычные ДНК-зависимые-ДНК-полимеразы обладают ограниченной активностью обратной транскриптазы: у дрожжей это  $\alpha$ - и, главным образом,  $\delta$ -полимеразы [49], а у млекопитающих это Pol-G и некоторые другие полимеразы [53]; РНК-синтез могут обеспечивать и РНК-зависимые-РНК-полимеразные (RDRP) активности. Названные рибонуклеотиды и активности могут быть связаны с функционированием в митохондриях предлагаемого гипотетического механизма. Тогда природа рибонуклеотидов, включаемых в D/L-нити митохондрий, и праймерные затравки, необходимые для синтеза отстающей ДНК-нити (L), не исключено, скорее связаны с системно действующим специальным механизмом (таким, как вПОТ), чем с хаотично воспроизводимыми суммарными продуктами протекающих в органелле процессов транскрипции, процессинга/деградации РНК, на которые ссылаются авторы [53].

**Изменчивость генов иммуноглобулинов и образование нуклеиновых эквивалентов эпитопа**

Известно, что при экспрессии перестроенных генов иммуноглобулинов обнаруживают, во-первых, редактирование РНК/ДНК, сопровождаемое класс-переключающими рекомбинациями и соматическими гипермутациями. Эти изменения осуществляются активационно-индуцируемой AID-цитидиндеаминазой (C→U/dC→dU переходы в РНК и ДНК) и группой тесно связанных цитидиндеаминаз семейства APOBEC3 (прежде всего, APOBEC3G/F, действующих предпочтительно при ДНК-рекомбинационных и ДНК-репаративных процессах). Эти ферменты, как и редактирующие РНК (A→I) аденозиндеаминазы семейства ADARs, по-видимому, играют важную роль в эволюционно связанных адаптивном и врожденном иммунных ответах против ретровирусов и ретротранспозонов. Кроме того, AID-цитидиндеаминаза способствует предотвращению онкогенной трансформации лимфоцитов, в частности вирусом лейкоза Абельсона (Ab-MLV) у мышей [20; 25; 26].

Изменчивость генов иммуноглобулинов может также осуществляться за счет встройки коротких нуклеотидных последовательностей предшественника микро-РНК или зрелой микро-РНК. Внутри локуса тяжелой цепи перестроенных генов иммуноглобулинов обнаруживают вставки последовательностей недопроцессированных (88 п.н.) и зрелых (22 п.н.) микро-РНК (miR-125b-1) [48]. Можно предполагать, что гипотетический механизм вариабельной поэпитопной обратной трансляции (ВПОТ) может функционировать в клетках иммунной системы. Размер микро-РНК (~22 нуклеотида) соответствует размеру гипотетических НЭ и демонстрирует потенциальную возможность НЭ участвовать в изменчивости нуклеотидной последовательности генома. Такая изменчивость не будет ограничиваться только изменением отдельных нуклеотидов.

Не исключено, что антигенпрезентирующая клетка (АПК) может процессировать чужеродный антиген (АГ) не только для обеспечения презентации АГ, когда на поверхности АПК выставляется фрагмент АГ в паре с АГ гистосовместимости I или II классов, но и для воспроизводства нуклеинового эквивалента эпитопа.

Эпитоп АГ может ретранслироваться в один из вариантов олигонуклеотида (НЭ), который встроится в РНК ретротранспозона. В составе ретровирусоподобных частиц, или в виде ДНК эквивалента, НЭ может быть перенесен в разные участки генома и в другие клетки. Межклеточный перенос, в процессе специфического иммунного ответа, возможен при тесном физическом контакте, возникающем, как известно, сначала между АПК и Т-клеткой, а затем между Т-клеткой и низкодифференцированной клеткой-предшественницей в костном мозге (и, возможно, тимусе).

Создавая изменчивость генома, образование НЭ может вести к появлению мутаций/гипермутаций в генах иммуноглобулинов, т.е. в антителах и рецепторах В- и Т-клеток зрелых лимфоцитов – дифференцированных потомках НДП-клеток.

**Заключение**

Мы предположили существование механизма вариабельной поэпитопной обратной трансляции, генерирующей короткие РНК. Теперь известно, что короткие РНК (21–27 нуклеотидов) участвуют в са-

мых разных биологических процессах, обеспечивающих с помощью вариантных механизмов РНК-интерференции важнейшие биологические процессы у эукариот: развитие организмов, иммунный ответ и апоптоз, контроль за раковым перерождением, поддержание стволовых клеток [8; 44; 48]. Еще несколько лет назад никто не представлял возможности существования таких способов регуляции. В этом контексте можно рассмотреть и вероятность существования предложенного гипотетического механизма образования коротких РНК, особенно, если учесть сенсационное недавнее открытие коротких РНК в геномах прокариот, обеспечивающих защитную функцию около 40 % бактерий и почти всех археобактерий от размножения чужеродной ДНК (плазмид и фагов). Этот механизм основан на функционировании локусов CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), включающих почти идентичные регулярно расположенные повторы (21–47 н.п.), перемежающиеся спейсерами (20–72 н.п.), очень сильно различающимися по нуклеотидной последовательности [21; 22; 34]. Спейсеры содержат последовательности, комплементарно гомологичные разным чужеродным ДНК (фагам, плазмидам, транспозирующим элементам), и их разнообразие и частота свидетельствуют о множественности актов инфицирования данной бактерии разными фагами. Локусы CRISPR транскрибируются с образованием длинного предшественника РНК (пре-РНК), который процессируется с образованием коротких (около 40 нуклеотидов) РНК, содержащих спейсерные последовательности. К локусам CRISPR прилегают гены, кодирующие нуклеазы и РНК-связывающие белки [19; 21], участвующие в процессировании пре-РНК и деградации чужеродной ДНК. Предполагается, что в составе комплексов этих белков находятся процессированные спейсерные последовательности, узнающие комплементарные последовательности чужеродной ДНК [29], т.е., предположительно, имеют место комплементарные ДНК-РНК взаимодействия – в отличие от РНК-РНК взаимодействий при РНК-интерференции (эукариот). Остается загадкой, каким образом спейсерные последовательности включаются в состав локусов CRISPR и почему они не взаимодействуют с ДНК прокариота-хозяина [28; 51].

Таким образом, короткие РНК, обладающие удивительными регуляторными и защитными функциями, обнаружены у эукариот и прокариот (средняя длина 20–30 нуклеотидов). Механизмы регуляции экспрессии генома с помощью этих РНК – различны: РНК-интерференция у первых, и подавление экспрессии чужеродной ДНК у вторых (соответственно РНК/РНК и РНК/ДНК типы интерференции и комплементарных взаимодействий). Различны и филогенетически не связаны белковые компоненты комплексов, процессирующих образование коротких РНК эукариот и прокариот [52].

Предполагается, что олигонуклеотиды (НЭ), воспроизводимые гипотетическим механизмом ВПОТ, комплементарно взаимодействуют как с короткими РНК, так и с их мишенями, и поэтому могут участвовать как в регуляторной, так и в защитной функциях клетки. Последние несколько лет каждый год приносит новые результаты, расширяющие представления о сфере функций коротких РНК. Если несколько лет назад здесь доминировали микро-РНК, то на сегодняшний день выявляется массивная регуляторная роль piРНК [40], механизм биогенеза которых, принципиально отличный от известного для микро-РНК, остается невыясненным.

Приведенный пример функционирования CRISPR локусов показывает существование удивительно динамичной адаптивной защитной системы прокариот, основанной на приобретении генов, кодирующих короткие РНК. Рассмотренные примеры функционирования коротких РНК, с нашей точки зрения, заставляют по-новому, без предубеждений, взглянуть на выше предложенные варианты механизмов «обратной трансляции» (РНК/белковой симметрии), результатом которой может быть образование коротких олигонуклеотидов.

*Автор выражает признательность и благодарность академику РАН В.А. Гвоздеву за тщательные смысловую и стилистическую правки статьи, профессору А.Ю. Барышникову – за постоянное содействие автору в выполнении работы данного направления, а также М. Нахимото – за предоставление возможности публикации рисунков 1 и 2.*

*Работы автора по тематике можно найти на сайте (<http://amdeich-var-reverse-translation.ru/>).*

### Литература

1. Альбертс Б., Брэй Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки (пер. с англ.; ред. Дж. Уотсон). – М.: Мир, 1987. – Т.3. – С. 105.
2. Бишоп Д., Эмерсон С.У. Радбовирусы и буньявирусы. Вирусология (пер. с англ.; ред. Филдс Б.Н., Кнайп Д.М.). – М.: Мир, 1989. – Т.2. – С. 366–445.
3. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот (пер. с англ.; ред. Вайнштейн Б.К.). – М.: Мир, 1987. – 584 с.
4. Зоров Д.Б. Митохондриальный транспорт нуклеиновых кислот. Участие бензодиазепинового рецептора // Биохимия. – 1996. – Т. 61, №7. – С. 1320–32.
5. Колесникова О.А., Энтелис Н.С., Крашенинников И.А., Мартен Р.П., Тарасов И.А. Импорт тРНК в митохондрии // Успехи биологической химии. – 2004. – Т.44. – С. 53–78.
6. Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития. – М.: изд. МГУ, 2002. – 263 с.
7. Кузьмин Е.В., Зайцева Г.Н. Организация и экспрессия митохондриального генома. – М.: ВИНТИ. Итоги Науки и Техники, 1987. – Т. 6. – С. 15–55.
8. Рязанский С.С., Гвоздев В.А. Короткие РНК и канцерогенез // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 5. – С. 640–55.
9. Спиринов А.С. Молекулярная биология. – М.: «Высшая школа», 1986. – 303 с.
10. Филиппович И.И., Ноздрина В.Н., Светлукин В.В., Опарин А.П. Изучение локализации транскрипционной и трансляционной систем в тонких структурах хлоропластов при гранообразовании. Молекулярная генетика митохондрий (ред. Нейфах С.А., Трошин А.С.). – Л.: Наука, 1977. – С. 11–20.
11. Юрина Н.П., Одицова М.С. Сравнительная характеристика структурной организации геномов хлоропластов и митохондрий растений // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 1. – С. 5–22.
12. Ausländer S., Ketzler P., Hartig J.S. A ligand-dependent hammerhead ribozyme switch for controlling mammalian gene expression // Mol. Biosyst. – 2010. – 6(5). – P. 807–14.
13. Babiarz J.E., Btleloch R. Small RNAs – their biogenesis, regulation and function in embryonic stem cells // Internet StemBook. The Stem Cell Research Community (Eds. Kevin E., Daley G.). – 2009. – doi/10.3824/stembook.1.47.1.
14. Baskus J.W., Smith H.C. Specific 3' sequences flanking a minimal apolipoprotein B (apoB) mRNA editing 'cassette' are critical for efficient editing in vitro // BBA. – 1994. – 1217(2). – P. 65–73.
15. Biro J.C. A novel intra-molecular protein-protein interaction code based on partial complementary coding of co-locating amino acids // Med Hypotheses. – 2006. – 66(1). – P. 137–42.
16. Blachnio K., Przykorska A. Specific arginine mediated RNA recognition // Postepy Biochem. – 2005. – 51(3). – P. 339–44.
17. Boeke J.D. The unusual phylogenetic distribution of retrotransposons: a hypothesis // Genome Res. – 2003. – 13(9). – P. 1975–83.
18. Boland C., Hayes P., Santa-Maria I. et al. Queuosine formation in eukaryotic tRNA occurs via a mitochondria-localized heteromeric transglycosylase // J. Biol. Chem. – 2009. – 284(27). – P. 18218–27.
19. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // Microbiology. – 2005. – 151. – P. 2551–61.
20. Brad R., Rosenberg F., Papavasiliou N. Beyond SHM and CSR: AID and related cytidine deaminases in the host response to viral infection // Advances in Immunology. – 2007. – 94. – P. 215–44.
21. Brouns S.J.J., Jore M.M., Lundgren E.R. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // Science. – 2008. – 321(5891). – P. 960–4.
22. Chakraborty S., Snijders A.P., Chakravorty R. et al. Comparative network clustering of direct repeats (DRs) and cas genes confirms the possibility of the horizontal transfer of CRISPR locus among bacteria // Mol. Phylogenet. Evol. – 2010. – 56(3). – P. 878–87.
23. Chaudhuri S., Maliga P. Sequences directing C to U editing of the plastid psbL mRNA are located within a 22 nucleotide segment spanning the editing site // EMBO J. – 1996. – 15(21). – P. 5958–64.
24. Connell G.J., Illangsekare M., Yarus M. Three small ribooligonucleotides with specific arginine sites // Biochemistry. – 1993. – 32. – P. 5497–502.
25. Eto T., Kinoshita K., Yoshikawa K. et al. RNA-editing cytidine deaminase Apobec-1 is unable to induce somatic hypermutation in mammalian cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – 100(22). – P. 12895–8.
26. Hamilton C.E., Papavasiliou FN, Rosenberg BR. Diverse functions for DNA and RNA editing in the immune system // RNA Biol. – 2010. – 7(2). – P. 220–8.
27. Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S. et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis // Nature. – 1993. – 363(6429). – P. 558–61.
28. Karginov F.V., Hannon G.J. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea // Mol. Cell. – 2010. – 37(1). – P. 7.
29. Koonin E.V., Wolf Yu. I. Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? // Biol. Direct. – 2009. – 4. – P. 42.

30. *Laitala-Linonen T.* Update on the development of microRNA and siRNA molecules as regulators of cell physiology // *Recent Pat DNA Gene Seq.* – 2010. – 4(2). – P. 113–21.
31. *Lakshmi S.S., Agrawal S.* piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – 36. – (Database issue): D173–177.
32. *Lambowitz A.M., Zimmerly S.* Mobile group II introns // *Annu. Rev. Genet.* – 2004. – 38. – P. 1–35.
33. *Liu Q., Paroo Z.* Biochemical principles of small RNA pathways // *Annu. Rev. Biochem.* – 2010. – 79. – P. 295–319.
34. *Marraffini L.A., Sontheimer E.J.* CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA // *Science.* – 2008. – 322(5909). – P. 1843–5.
35. *Megraw M., Sethupathy P., Corda B., Hatzigeorgiou A.G.* miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – 35 (Database issue): D149–D155.
36. *Meli M., Albert-Fournier B., Maurel M.C.* Recent findings in the modern RNA world // *Int. Microbiol.* – 2001. – 4(1). – P. 5–11.
37. *Nashimoto M.* The RNA/protein symmetry hypothesis: experimental support for reverse translation of primitive proteins // *J. Theor. Biol.* – 2001. – 209. – P. 181–7.
38. *Perucho M.* Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes // *Oncogene.* – 2003. – 22(15). – P. 2223–5.
39. *Reichert A.S., Morl M.* Repair of tRNAs in metazoan mitochondria // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – 28(10). – P. 2043–8.
40. *Rigoutsos I.* Short RNAs: how big is this iceberg? // *Current Biology.* – 2010. – 20(3). – R110–R113. (doi:10.1016/j.cub.2009.12.036).
41. *Roitzsch M., Pyle A.M.* The linear form of a group II intron catalyzes efficient autocatalytic reverse splicing, establishing a potential for mobility // *RNA.* – 2009. – 15(3). – P. 473–82.
42. *Rubio M.A., Pastar I., Gaston K.W. et al.* An adenosine-to-inosine tRNA-editing enzyme that can perform C-to-U deamination of DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – 104(19). – P. 7821–6.
43. *Shields D.C., Wolfe K.H.* Accelerated evolution of sites undergoing mRNA editing in plant mitochondria and chloroplasts // *Mol. Biol. Evol.* – 1997. – 14(3). – P. 344–9.
44. *Shimabe M., Goyama S., Watanabe-Okochi N. et al.* Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells // *Oncogene.* – 2009. – 28(49). – P. 4364–74.
45. *Shivdasani R.A.* MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation // *Blood.* – 2006. – 108(12). – P. 3646–53.
46. *Siemion I.Z., Cebrat M., Kluczyk A.* The problem of amino acid complementarity and antisense peptides // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2004. – 5(6). – P. 507–27.
47. *Simpson L., Maslov D.A., Blum B.* RNA editing in *Liechmania* mitochondria. RNA editing. The alteration of protein coding sequences of RNA (Ed. Benne R.). – London: Ellis Horwood Ltd, 1993. – P. 53–85.
48. *Sonoki T., Iwanaga E., Mitsuya H., Asou N.* Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia.* – 2005. – 19. – P. 2009–10.
49. *Storici F., Bebenek K., Kunkel Th.A. et al.* RNA-templated DNA repair // *Nature.* – 2007. – 447(7142). – P. 338–41.
50. *Symons R.H.* Small catalytic RNAs // *Annu. Rev. Biochem.* – 1992. – 61. – P. 641–71.
51. *Van der Oost J., Jore M.M., Westra E.R. et al.* CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes // *Trends Biochem. Sci.* – 2009. – 34(8). – P. 401–7.
52. *Visomirski-Robic L.M., Gott J.M.* Insertional editing of nascent mitochondrial RNAs in *Physarum* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – 94(9). – P. 4324–9.
53. *Yang M.Y., Bowmaker M., Reyes A. et al.* Biased Incorporation of Ribonucleotides on the Mitochondrial L-Strand Accounts for Apparent Strand-Asymmetric DNA Replication // *Cell.* – 2002. – 111. – P. 495–505.
54. *Zhuang F., Mastroianni M., White T.B., Lambowitz A.M.* Linear group II intron RNAs can retrohome in eukaryotes and may use nonhomologous end-joining for cDNA ligation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – 106(43). – P. 18189–94.
55. *Zorova L.D., Krasnikov B.F., Kuzminova A.E. et al.* Virus-induced permeability transition in mitochondria // *FEBS Letters.* – 2000. – 466. – P. 305–9.

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



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

Таблицы должны быть компактными, иметь название, не повторять графики, не должны содержать пустых ячеек (отсутствие данных должно отмечаться тире, «нет данных» или специальным примечанием). Все уточнения и локальные сокращения выносятся в примечания. Таблицы набираются тем же шрифтом, что и основной текст статьи с выравниванием по левому краю, без переносов и красных строк. Точку после последнего слова в ячейке ставить не нужно. Примечания к таблицам выносятся в последней строке таблицы тем же шрифтом. Каждое примечание должно располагаться с новой строки, помечено надстрочной цифрой, которая отделяется от текста примечания пробелом. В конце каждого примечания ставится точка. Примечания нумеруются в соответствии с их появлением в таблице: сверху вниз и слева направо. Размер каждого рисунка (даже если они смаскетированы вместе) должен быть не менее 10 × 15 см. Рентгенограммы должны быть представлены в негативном изображении. Иллюстрации сканируют в масштабе 100 % с разрешением 300 dpi. Рентгенограммы, сонограммы, фотографии сканируют в режиме «Gray».

Если под одной подписью планируется несколько рисунков, каждый должен быть прислан отдельно и соответствовать указанному выше требованиям по качеству.

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

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

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

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

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

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

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

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

Руководство по гематологии под ред. А.И. Воробьева. – Т. 2. – М.: Ньюдиамед, 2004. – 277 с.  
*Bihrl R., Libertino J.A. Renal cell cancer with extension into the vena cava. In: Dekernion B.J., Pavone-Macaluso M. eds., Tumors of kidney. – Baltimore: Williams&Wilkins, 1986. – P. 111–123.*

УДК 612.014.464

*Н.Г. Кормош***ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ  
АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА  
(СУБКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ) – ВЗГЛЯД КЛИНИЦИСТА***РОИЦ им Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Наталья Геннадьевна Кормош, врач-хирург отделения опухолей женской репродуктивной системы НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-98-35**e-mail:** [nkormosh@hotmail.com](mailto:nkormosh@hotmail.com)

Статья поступила: 29.04.2011, принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

Эволюционно сформированная редокс-гомеостатическая система включает активные формы кислорода и антиоксидантную систему.

Показано, что АФК постоянно образуются и являются необходимым компонентом жизнедеятельности клеток и организма в целом.

Для поддержания физиологического уровня АФК требуется постоянная регенерация различных компонентов АОС, а это активные энергоемкие процессы, требующие согласованной работы на всех уровнях организма, клеток, клеточных структур и генов.

**Ключевые слова:** АФК, физиология, редокс-гомеостаз.*N.G. Kormosh***PHYSIOLOGICAL ROLE  
OF A REACTIVE OXYGEN SPECIES  
(SUBCELLULAR LEVEL) – CLINICIAN VIEWPOINT***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Evolutionarily formed redox homeostatic system includes a reactive oxygen species and antioxidant system.

ROS are generated continuously and are an essential component of cell activity.

To maintain the physiological level of ROS requires constant regeneration of the various components of the AOS. This regeneration is the active energy-consuming processes that require coordinated interaction at all levels of the organism, cells, cellular structures and genes.

**Key words:** ROS, physiology, redox homeostasis.**Введение**

Выявление в последние годы так называемых коротких РНК (21–30 нуклеотидов) продемонстрировало неожиданные и непредсказуемые возможности новых способов контроля экспрессии генов и стабильности генома эукариот.

Выявлены три основных типа коротких РНК: микро-РНК [35; 45], эндогенные малые интерферирующие РНК, или siRNA (small interfering RNA) [30; 33] и piRNA, связываемые так называемыми Piwi (Piwi-interacting RNA) белками [31].

Все эти типы РНК участвуют в регуляции экспрессии генов, а siРНК и piРНК направлены также на подавление экспрессии транспозонов и обеспечение стабилизации геномов.

Уже совсем недавно была обнаружена защитная роль коротких РНК (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats RNAs, или crRNAs) у прокариот [21; 34].

Поэтому представляет интерес рассмотреть возможности существования других, сейчас, казалось бы, невероятных, способов возникновения в клетке коротких олигорибонуклеотидов, которые могут быть использованы для аналогичных регуляторных или защитных целей. Впервые предположение о появлении свободных радикалов в ходе ферментативных

реакций было высказано в 1931 г. немецким биохимиком L. Michaelis. А.Н. Бах и К.О. Энглер разработали теорию горения, согласно которой окисление происходит в две стадии с образованием промежуточного пероксидного соединения. Ведущая роль в изучении АФК и их производных принадлежит Б.Н. Тарасову, который впервые в мире применил методы привитой радикальной сополимеризации и хемилюминесценции для регистрации свободных радикалов в тканях.

В 1954 г. он показал, что в тканях животных под действием ионизирующей радиации появляются токсичные продукты свободнорадикального окисления липидов – перекиси ненасыщенных жирных кислот [1]. Кроме того, он высказал предположение, что динамика накопления активных свободно-радикальных производных в организме будет прямо пропорциональна накоплению симптомов и тяжести патологического процесса, что объяснялось токсическим воздействием свободных радикалов на мембраны клеток.

В том же 1954 г. ученые Вашингтонского университета (University of Washington) В. Compton, J. Townsend и G. Pake обнаружили и классифицировали сигналы электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) свободных радикалов в различных тканях животных.

Они показали, что интенсивность ЭПР-сигналов существенно отличается в различных тканях, что, в свою очередь, предполагало зависимость количества свободных радикалов от метаболических процессов [7].

В те же годы Н.М. Эмануэль выдвинул гипотезу о том, что свободные радикалы могут играть роль в онкогенезе и росте опухолей. В 1956 г. D. Harman высказал идею: в организме могут протекать реакции с образованием свободных радикалов, и эти реакции лежат в основе повреждения клеток, мутагенеза, рака, и, не в последнюю очередь, дегенеративного процесса биологического старения [17].

В 1969 г. J.M. Mac Cord и I. Fridovich обнаружили фермент супероксиддисмутазу и убедили большинство коллег научного мира, что свободные радикалы играют важную роль в биологии.

С учетом методов косвенной регистрации действия свободных радикалов и возможности определения ферментов, которые нейтрализуют активность радикалов, многими исследователями *in vitro* изучено повреждающее окислительное действие радикалов на ДНК, белки, липиды и другие компоненты клеток. Другими исследователями показано, что данные, полученные в эксперименте, не могут быть формально перенесены на реакции клеток в организме. Среди причин ограничения использования полученных данных называются сами условия эксперимента: применяемые дозы АФК (в частности – перекиси водорода) и условия культивирования клеток, которые зачастую не физиологичны.

Патологическая роль радикалов показана для многих заболеваний, в том числе лучевой болезни, сахарного диабета, целого ряда бронхо-легочных, сердечно-сосудистых, ревматоидных болезней, патологии нервной системы, злокачественных новообразований. Процесс ПОЛ изучен наиболее подробно. Изменения, выражающиеся в интенсификации процессов ПОЛ при любой патологии, оказались однотипны, но корреляция с тяжестью клинических проявлений заболевания получена далеко не во всех случаях. Обобщая эти исследования, была сформулирована концепция перекисной гибели клетки, а сам процесс ПОЛ признан губительным для организма. С другой стороны, интенсификация процесса наблюдается с увеличением возраста при отсутствии клинически значимой патологии. Возможности коррекции наблюдаемых изменений антиоксидантами оказались не однозначными.

Во-первых, их прием в большинстве случаев сопровождался некоторым снижением, но не нормализацией показателей ПОЛ; а в некоторых исследованиях на фоне приема антиоксидантов наблюдалась дальнейшая интенсификация процессов ПОЛ.

Во-вторых, полученный эффект оказался непродолжительным. Более того профилактический прием витаминов с антиоксидантным действием (ретинол,  $\beta$ -каротин), как показали исследования, может приводить к росту заболеваемости злокачественными новообразованиями [25], а комплекс витаминов не уменьшает риск сердечно-сосудистых заболеваний [20]. Другими исследователями представлены данные о не менее эффективной коррекции изменений прооксидантами, т.е. веществами с противоположным антиоксидантам действием.

С другой стороны, показана регуляторная роль АФК в процессе жизнедеятельности клеток, а также их участие в синтезе биологически активных веществ. Для того, чтобы дать правильную оценку полученным в эксперименте и клинике результатам и разрешить множество накопившихся противоречий, необходимо,

прежде всего, понимание физиологической роли АФК. Эти знания необходимы не только исследователям, но и клиницистам для разработки адекватной тактики лечения, поскольку окислительный стресс обнаружен при многих заболеваниях.

Представленный обзор литературы посвящен вопросу физиологической роли АФК, и разделен на две части: 1 – источники АФК и антиоксидантной системы; действие АФК на субклеточном уровне; 2 – действие АФК на клеточном уровне и в организме в целом.

### **Источники АФК и антиоксидантной системы**

Новый импульс в изучении свободно-радикальных процессов и роли АФК дало развитие клеточной и молекулярной биологии и генетики.

Прежде всего, показано, что в клетках АФК образуются постоянно, а источниками их образования являются многие клеточные структуры и многочисленные ферменты. Основным источником АФК в клетке являются митохондрии, в которых потребляемый кислород восстанавливается до воды в процессе окислительного фосфорилирования. Однако часть потребляемого кислорода (около 2 %) идет на образование АФК путем одноэлектронного восстановления при помощи ферментов – НАДФН-оксидазы, ксантинооксидазы, а также убихиноном, которые являются компонентами цепи переноса электронов митохондрий [3]. Кроме того, описано образование АФК во многих других клеточных системах, в том числе: пероксисомах, лизосомах, микросомах, эндоплазматическом ретикулуме, цитозоле, протеосомах а также цитоплазматической мембране.

АФК образуются многими ферментами, в том числе митохондриальными комплексами, изоформами НАДФН-оксидазы, цитохромом P450, ксантинооксидазой, циклооксигеназой, липоксигеназой. В большинстве случаев образование АФК связано с метаболическими путями в клетках, такими как окисление жирных кислот [5] и углеводов, окислительной конформации белков. При этом образование АФК находится под строгим метаболическим контролем, который включает компартиментализацию окислительных реакций [26].

Реактивные формы кислорода, идентифицированные в клетках, включают в себя свободные радикалы, такие как супероксид-анион ( $O_2^{\bullet-}$ ), гидроксильный радикал ( $OH^{\bullet}$ ), перекисные радикалы ( $RO_2^{\bullet}$ ), а также молекулы нерадикальной природы, которые являются окислителями и/или легко превращаются в радикалы, такие как перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гипохлорная кислота ( $HOCl$ ) и синглетный кислород ( $^1O_2$ ). Однако часто различные активные формы сосуществуют в реактивной среде и трудно определить однозначно агента, который вызывает данный биологический эффект.

Супероксидный радикал образуется в клетке с помощью ферментов (НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза) или неферментативно в реакции с семиубихиноном в митохондриальной цепи электронного транспорта. В присутствии металлов переменной валентности (например, ионов железа или меди), перекись водорода может быть преобразована в гидроксильный радикал (реакция Фентона). Период полураспада гидроксильного радикала *in vivo* составляет около  $10^{-9}$  сек., что в совокупности с его высокой реактивной способностью приводит к тому, что радикал мгновенно реагирует с любой окисляемой молекулой в ближайшем окружении, практически он является одним из наиболее опасных агентов, образующихся в организме.

Среди всех АФК перекись водорода представляется наиболее распространенной молекулой, потому что постоянно образуется в митохондриях в процессе физиологического обмена веществ, является относительно стабильной молекулой и в тоже время сильным окислителем; молекула достаточно мала, чтобы диффузно проникать через биомембраны. Кроме того недавно были обнаружены аквапорины, первоначально описанные как водные каналы, которые присутствуют во всех живых клетках и способствуют диффузии перекиси водорода через клеточные мембраны [4]. Переход перекиси водорода через мембрану способствует, с одной стороны, распространению редокс-сигнала внутри одной клетки, с другой – обеспечивает межклеточное взаимодействие, оказывая влияние на окружающие клетки. Таким образом, способность к диффузии АФК дает возможность вызывать множественные внутриклеточные реакции, а также – инициировать тканевые реакции, такие как массовая гибель клеток [27].

АФК постоянно образуются в клетках и тканях в низких, но измеримых концентрациях [31], что определяется балансом между скоростью образования и дезактивации их антиоксидантами. Поддержание этого равновесия необходимо на всех уровнях: от клеточных органелл и мембран до организма в целом. Поэтому для поддержания гомеостаза, в частности окислительного, необходима непрерывная регенерация антиоксидантной активности. Антиоксиданты по определению – вещества, способные при относительно низких концентрациях конкурентно взаимодействовать с активными свободными радикалами, и, таким образом, значительно уменьшать или препятствовать окислению других субстратов. АО-свойствами обладают многие вещества различной химической природы. Общепринятой классификации на сегодняшний день не существует. Как правило, выделяют жирорастворимые и ферментативные АО. Жирорастворимые биоантиоксиданты (фосфолипиды,  $\alpha$ -токоферол, витамин А, каротиноиды, убихинон, витамины группы К, стероидные гормоны) осуществляют свою защитную функцию в биологических мембранах, водорастворимые (аскорбиновая, лимонная, никотиновая кислоты; серосодержащие соединения; липоевая кислота; церулоплазмин; полифенолы; флавоноиды; трансферрин; лактоферрин; альбумин; мочевина и мочевая кислота) – в цитозоле клеток, межклеточной жидкости, плазме крови, лимфе. Однако природа многих из этих соединений двойственная: одна и та же молекула (ион) может быть как окислителем, так и восстановителем в зависимости от свойств молекулы (иона), с которой происходит взаимодействие, а также от среды, в которой осуществляется реакция. Примером может служить аскорбиновая кислота, которая обладает широким спектром антиоксидантных свойств: снижает уровень АФК (супероксидного радикала, синглетного кислорода, гидроксильного, перекисного и органических радикалов), восстанавливает окисленную форму витамина Е и глутатиона. Однако в присутствии ионов железа и меди, при изменении показателей крови (уровень pH или оксигенации), а также при исходно её высокой концентрации в крови аскорбиновая кислота проявляет выраженные прооксидантные свойства и активно инициирует реакции ПОЛ. Аскорбиновая кислота проявляет антиоксидантные свойства, но это не единственная ее роль в организме. Она также принимает участие в синтезе коллагена и эластина, в обмене холестерина, гистамина и ацетилхолина.

Экспериментальные данные показывают, что эффект неферментативных антиоксидантов определяется не только их антиоксидантными свойствами по утилизации свободных радикалов. Помимо роли в клеточной антиоксидантной защите все неферментативные антиоксиданты играют важную роль в реализации физиологических функций клеток: участвуют в регуляции активности факторов транскрипции, модулируют клеточные сигнальные пути, принимают участие в регуляции клеточного цикла, а также процессах дифференцировки, пролиферации и гибели клеток [21].

Первую линию защиты от свободных радикалов представляют антиоксидантные ферменты супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы. Они находятся во всех аэробных клетках и характеризуются высокой избирательностью действия, направленного против определенных радикалов, специфичностью клеточной и органной локализации, а также использованием в качестве стабилизаторов металлов переменной валентности. Скорость реакции чрезвычайно высока (лимитируется только скоростью диффузии АФК) и не требует энергии для активации.

Супероксиддисмутазы обеспечивают превращение супероксидного анион-радикала в менее активный окислитель – перекись водорода. Различия в свойствах супероксидного радикала (заряжен, активен, не способен преодолеть мембранный барьер) и перекиси водорода (не заряжен, относительно инертен, легко проникает через клеточную мембрану) объясняет важную роль СОД в регуляции распространения АФК от места образования в направлении как внутриклеточно, так и между клетками. СОД – водорастворимый фермент, поэтому супероксидный радикал, генерируемый в мембране, оказывается для него малодоступным. В клетках млекопитающих обнаружены три изоформы фермента – Cu, Zn-СОД (цитозольная), Cu, Zn-гликозилированная СОД (экстрацеллюлярная) и Mn-СОД (митохондриальная).

Каталаза обеспечивает расщепление перекиси водорода до 2 молекул воды и кислорода; из-за большого молекулярного веса практически не проникает через клеточные мембраны.

Во всех животных тканях содержится тиоловый трипептид глутатион. Низкая молекулярная масса определяет его мобильность, а наличие сульфгидрильной связи – активность. Восстановленный глутатион участвует во многих клеточных процессах: детоксикации перекиси водорода и гидроперекисей, которые возникают при реакции АФК с полиненасыщенными жирными кислотами мембран; нейтрализации гидроксильного радикала, образующегося в реакции Фентона, или в результате радиолитической воды под действием ионизирующих излучений. Глутатион – основной антиоксидант эритроцитов, он служит коферментом при восстановлении метгемоглобина в функционально активный гемоглобин; является основным агентом, защищающим тиоловые ферменты (цикла Кребса, тканевого дыхания) от окисления. Его антиоксидантное действие катализируют глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза. Глутатионпероксидаза содержит селен и играет основную роль в инактивации липидных, белковых, а также нуклеиновых гидроперекисных соединений. Глутатионредуктаза поддерживает достаточный уровень активного глутатиона путем восстановления его дисульфидной формы. Основной функцией глутатион-S-трансферазы является детоксикация токсических соединений путем конъюгирования их с глутатионом.

Глутатион, а также другие низкомолекулярные тиолы, такие как тиоредоксин и глутаредоксин объединяют в тиоловую систему, поскольку соотношение восстановленных и окисленных SH-групп в биосредах (редокс-пар) определяет их потенциальную способность к окислительной модификации и играет важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза. Редокс-парой также является НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН. НАДФН имеет самый низкий потенциал для восстановления и, следовательно, является источником для функционирования других редокс-пар [28].

Аминокислоты и белки также могут нейтрализовать АФК, причем эта реакция менее эффективна и специфична, чем с классическими антиоксидантами, но их совокупная внутриклеточная концентрация значительно выше. АФК участвуют в модификации белков, что приводит к изменениям в функции белка, химической фрагментации или повышенной восприимчивости к протеолизу. Протеолиз белков осуществляется в основном в протеасомах. В одном из исследований выявлено, что протеолиз увеличился более чем в 11 раз после контакта с супероксидом или перекисью водорода [8]. В то же время этот эффект оказался дозозависимым: протеолиз повышался при концентрациях 20–400 моль перекиси водорода, а при миллимолярных концентрациях протеолиз ингибировался, что приводило к накоплению внутриклеточных окисленных белков [15]. С другой стороны, было показано, что инактивация АФК не измененными по структуре белками значительно слабее, чем белками с нарушенной структурой или эквивалентными концентрациями составляющих их аминокислот [11]. Поэтому свободные аминокислоты также являются важными утилизаторами АФК. Практически все аминокислоты могут служить мишенями для АФК, хотя некоторые аминокислоты, такие как триптофан, тирозин, гистидин, цистеин и метионин особенно чувствительны к АФК [9]. Из них только две аминокислоты, цистеин и метионин, могут быть восстановлены ферментативным путем, окислительные изменения других аминокислот необратимы. Таким образом, АФК осуществляют физиологический контроль синтеза белка в клетке, при окислительном стрессе их взаимодействие с белками носит дозозависимый характер, а восстановление поврежденных белков возможно только в ограниченных случаях.

Наличие в организме многочисленных антиоксидантных соединений обеспечивают высокую базальную буферную емкость, которая может быть существенно увеличена, например, за счет протеолитической деградации.

#### *Действие АФК на субклеточном уровне*

АКМ могут как обратимо, так и необратимо окислять или восстанавливать любую органическую молекулу, но в низких дозах легче взаимодействуют с молекулами, в состав которых входит ион с переменной валентностью (ими в большинстве случаев являются сера и железо). С точки зрения биоорганической химии такими молекулами будут белки, включающие цистеин, а также железосодержащие белки. Из них наиболее значимы белки, содержащие цистеин и железо в активном центре. Биологической сущностью такого взаимодействия является потенциальная обратимость, цикличность реакции. Показано, что степень окисления серы в цистеине с образованием дисульфидов ( $-SSR$ ), сульфеновых кислоты ( $-SOH$ ), сульфиновых кисло-

ты ( $-SO_2H$ ) или сульфокислоты ( $-SO_3H$ ) зависит от уровня АФК [34]. Образование последнего соединения необратимо, а восстановление дисульфидных связей возможно при наличии доноров протонов НАДФН и энергии АТФ.

Большинство ферментов центральных энергетических путей метаболизма являются тиолсодержащими белками, а активность других определяется фосфорилированием.

В митохондриях образование АФК определяется уровнем метаболизма клетки, и при отсутствии адекватной утилизации АФК служат элементом отрицательной обратной связи, блокируя ферменты цикла Кребса и осуществляя переход с аэробного на анаэробный гликолиз, а также обеспечивая соответствие энергетического метаболизма потребности и возможности клетки. Образование АФК в митохондриях зависит также от наличия митохондриальных энергетических субстратов. Избыток субстратов обычно предотвращается жестким регулированием ключевых ферментов гликолиза. Фосфофруктокиназа, один из первых ферментов на этом пути, ингибируется конечными продуктами цикла Кребса (АТФ и цитратом) и соотносит таким образом образование пирувата и ацетил СоА с клеточным энергопотреблением.

К клеточным белкам, активный центр которых включает ионы переменной валентности, относятся многие ферменты, в том числе киназы, катализирующие перенос фосфатной группы от молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) на различные субстраты. Многочисленные исследования подтверждают, что АФК активизируют фосфорилирование белков путем дисульфидного окисления протеинкиназ, а также инактивируют каталитическую активность фосфатаз, что ведет к фосфорилированию белков и изменению их функциональной активности. Например, все известные тирозинфосфатазы имеют в активном центре остаток цистеина. Биохимические данные свидетельствуют о том, что инактивирование активности таких ферментов может осуществляться двумя способами: окисление остатков цистеина АФК или связывание с дисульфидом глутатиона (глутатионилирование). Н. Sun и N. Tonks, изучая процесс фосфорилирования белков, пришли к выводу, что активности тирозинфосфатаз на несколько порядков выше, чем тирозинкиназ. Поэтому для осуществления реакции с участием тирозинкиназ, активность тирозинфосфатаз должна жестко регулироваться как за счет определенной субклеточной локализации, так и за счет их фосфорилирования [33].

В совокупности эти результаты указывают, что тирозинфосфатаза является типичным примером регуляторного белка, отвечающего на изменения редокс-состояния, а сам процесс фосфорилирования белков – редоксзависимым.

К семейству тирозинкиназ относятся рецепторы инсулина, рецепторы факторов роста, включая тромбоцитарный и эпидермальный. Особенностью таких рецепторов является возможность аутофосфорилирования. При активации рецепторы с тирозинкиназной активностью могут фосфорилировать сами себя.

Изучение влияния АФК на рецептор инсулина преимущественно проводилось на клеточных линиях адипоцитов. Прежде всего, показано, что уровень и длительность воздействия АФК имеют важное значение для функционирования рецептора. Физиологическая миллимолярная концентрация АФК усиливает клеточный ответ на инсулин.

Показано, что стимуляция инсулином своего рецептора приводит также к активации НАДФН-оксидазы и образованию АФК, которые, в свою очередь, инактивируют тирозинфосфатазы, что приводит к фосфорилированию тирозиновых/цистеиновых остатков, как в самом рецепторе инсулина, так и в ферментах, участвующих в сигнальном каскаде [22]. Учитывая неспецифичность действия АФК, возможно также фосфорилирование других тирозинкиназных рецепторов, что подтверждается синергизмом действия рецепторов.

При воздействии на клетки перекиси водорода в высоких (не физиологических) концентрациях обнаружен эффект инсулиннезависимого фосфорилирования рецептора инсулина, что сопровождалось инсулиноподобными эффектами при отсутствии инсулина [24]. Длительное воздействие умеренных концентраций перекиси водорода уменьшало эффект инсулина [35].

D. Wang с соавт., изучая фибробласты сердца новорожденных мышей, обнаружили, что активация рецептора ангиотензина II сопровождается активацией других мембранных рецепторов, таких как рецепторы эпидермального и тромбоцитарного фактора роста [36]. В механизме множественной активации трансмембранных тирозинкиназных рецепторов установлена важная роль генерации АФК НАДФН-оксидазой, которые способствуют аутофосфорилированию мембранных рецепторов и индукции сигнальных каскадов [30]. Таким образом, АФК могут способствовать синергетическому взаимодействию между различными типами мембранных рецепторов.

Исследования в последнее десятилетие позволили установить факт участия АФК в передаче сигнала от рецептора к клеточному ядру и существовании особой, зависимой от АФК, регуляторной, редокс-сигнальной системы [12]. Особенностью этой системы является также возможность реагировать на изменения уровня АФК без участия специализированных рецепторов. Передача сигнала реализуется путем обратимого окисления, фосфорилирования или глутатионилирования белков, что позволяет им принимать и быстро передавать сигналы, опосредованные действием АФК. Поскольку АФК образуются из различных внутриклеточных источников и при многих воздействиях на клетку, такая система приема и передачи сигнала является неспецифической. Это приводит к тому, что практически любой ответ клетки помимо специфической компоненты, содержит и неспецифическую составляющую, опосредованную действием АФК. Кроме того, мембранные рецепторы могут функционировать одновременно в качестве датчика для внеклеточных сигналов и как датчик для внутреннего метаболического состояния отдельной клетки.

Многоуровневая система передачи сигнала внутри клетки, включающая и функциональный ответ на сигнал, и неспецифическую составляющую, оказываются тесно переплетенными между собой. Это обстоятельство имеет важное биологическое последствие: сбой в регуляции ведет к гибели клетки, что для организма в целом является защитным эффектом.

АФК принимают участие в регуляции внутриклеточных процессов [19]. На сегодняшний день известно более 20 факторов транскрипции, активность которых модулируется редокс-балансом в клетках млекопитающих за счет наличия цистеиновых остатков в их ДНК-связывающих доменах. Показано, что активация редокс-чувствительных факторов транскрипции NF-κB, AP-1, p53 в клетках

животных и человека приводит к изменению экспрессии нескольких сотен генов и, соответственно, активности многих ферментативных процессов [2]. К изученным редокс-чувствительным сигнальным каскадам относятся митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) – p38 МАРК, c-Jun N-терминальные киназы (JNK), экстрацеллюлярные сигнал-регулируемые киназы 1 и 2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2 – ERK1/2).

Редокс-сигнализация обнаружена практически у всех живых организмов, включая бактерии. Регуляторные процессы включают защитные реакции от окислительного повреждения. Повышение концентрации АФК вызывает во многих клетках экспрессию генов, продукты которых обладают антиоксидантной активностью, что приводит к увеличению буферной емкости и восстановлению редокс-гомеостаза. Таким образом, редокс-гомеостаз клетки, определяемый соотношением уровня АФК и антиоксидантной буферной емкостью, может наблюдаться как при низком, так и высоком уровне АФК. Но при высоком уровне АФК состояние гомеостаза достигается за счет активизации сигнальных путей и экспрессии соответствующих генов. Однако длительная генерация аномально большого количества АФК может привести к стойким изменениям в трансдукции сигнала и экспрессии генов и возникновению патологических состояний [10].

Редокс-состояние клеток зависит не только от уровня АФК, но и от внутриклеточного уровня буферной АОС. Уменьшение емкости буферной системы может быть вызвано как расходом компонентов её составляющих, так и нарушением их синтеза или восстановления. Показано, что изменение соотношения тиоловых/дисульфид соединений в клетке вызывает изменения тех же сигнальных путей, что и перекись водорода [18; 32].

Окислительно-восстановительный гомеостаз включает регуляторные механизмы, которые способны контролировать как образование АФК, так и емкость буферной АОС системы.

Установлено, что у бактерий при росте АФК наблюдается изменение активности факторов транскрипции OxyR и SoxR, которое сопровождается синтезом Mn-СОД, каталазы, глутатионредуктазы, глутаредоксина [37]. При этом изменения структуры и соответственно активности OxyR происходит за счет образования множественных дисульфидных связей. Кроме того, окисленный белок OxyR связан отрицательной обратной связью с его синтезом [6]. Окисление активного центра белка SoxR в условиях окислительного стресса стимулирует транскрипцию sox-локуса, что приводит к синтезу белков с антиоксидантными свойствами [13]. В нормальных физиологических условиях, белок SoxR (содержащий активный центр 2Fe-2S) находится в восстановленном состоянии и не активен. Таким образом, рост АФК эффективно контролируется в клетках бактерий путем изменения активности факторов транскрипции OxyR и SoxR. Более сложная система редокс-регуляции обнаружена у одноклеточных грибов. Добавление перекиси водорода к культуре *S. cerevisiae* сопровождается индукцией фактора транскрипции AP-1. Обнаружено, что ответный синтез протеинов зависит от уровня как перекиси водорода, так и белка AP-1. Воздействие малых доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сопровождалось продукцией тиоредоксина, увеличение концентрации перекиси водорода сопровождалось гиперэкспрессией AP-1 и дополнительным синтезом СОД, глутатион-редуктазы, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы [29].

Длительное воздействие высоких доз перекиси водорода на *S. cerevisiae* приводило к активации синтеза 115 белков и подавлению синтеза 52 белков [14].

Индукцированные белки идентифицированы, ими оказались антиоксидантные ферменты, такие как: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, глутатион-редуктаза, каталаза, тиоредоксин-редуктаза, цитохром-с-пероксидаза и белки теплового шока. Воздействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> также приводило к блокированию синтеза белков, ответственных за биосинтетические процессы и стимулированию деградации собственных белков за счет активации синтеза субединиц протеасом. Также отмечено изменение углеводного обмена – быстрый переход углеводного метаболизма с аэробного на анаэробного гликолиз. Таким образом, рост АФК у одноклеточных грибов вызывает дозозависимый многокомпонентный ответ, не только защитный, антиоксидантный, но и изменение метаболизма белков и углеводов.

### **Заключение**

АФК постоянно образуются и являются необходимым компонентом жизнедеятельности клеток и организма в целом. Они принимают участие во многих метаболических и регуляторных процессах. Условием осуществления всех этих процессов является поддержание физиологического уровня АФК за счет функционирования АОС. Наличие в организме многочисленных антиоксидантных соединений обеспечивают высокую базальную буферную емкость АОС, которая может быть существенно увеличена, например, за счет протеолитической деградации. АФК и АОС образуют редокс-гомеостатическую систему, обеспечивающую возможность функционального ответа на сигнал. Для поддержания физиологического уровня АФК требуется постоянная регенерация различных компонентов АОС, а это активные энергоемкие процессы, требующие согласованной работы на всех уровнях организма, клеток, клеточных структур и генов.

Эволюционно сформированный редокс-гомеостаз представляет собой саморегулирующуюся систему. Это означает, что изменение любого из её компонентов ведет к дисбалансу, который, в свою очередь, приводит к компенсаторным реакциям на локальном уровне.

На сегодняшний день нет сомнений, что непосредственное действие АФК может быть пагубным для клетки в связи с окислительным повреждением липидов, белков и ДНК.

### **Литература**

1. *Тарусов Б.Н.* Основы биологического действия радиоактивных излучений. – М.: Медгиз, 1954. – 140 с.
2. *Турпаев К.Т.* Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. – 2002. – 61(3). – С. 339–52.
3. *Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T.* Mitochondria, oxidants, and aging // Cell. – 2005. – 120(4). – P. 483–95.
4. *Bienert G.P., Møller A.L., Kristiansen K.A.* et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes // J Biol Chem. – 2007. – 282(2). – P. 1183–92.
5. *Browning J.D., Horton J.D.* Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury // J. Clin. Invest. – 2004. – 114. – P. 147–52.
6. *Christman M.F., Storz G., Ames B.N.* OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins // Proc Natl Acad Sci USA. – 1989. – 86. – P. 3484–8.
7. *Commoner B., Townsend J., Pake G.E.* Free radicals in biological materials // Nature. – 1954. – 174. – P. 689–91.
8. *Davies K.A., Goldberg A.L.* Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes // J Biol Chem. – 1987. – 262. – P. 8220–6.

Конечными продуктами этого окисления являются гидроперекиси липидов, карбонилированные белки [23] и окисленные основания ДНК (например, 7,8-дигидро-8-оксогуанин [16]). Однако наводнение системы антиоксидантами или гиперэкспрессия антиоксидантных ферментов могут быть столь же пагубны, как и чрезмерное воздействие свободных радикалов.

Неспецифичность и распространенность окислительного стресса в клетках организма приводит к использованию энергетических субстратов и жизненно необходимым белковым молекулам для сбалансирования редокс-системы, и, в зависимости от длительности окислительного стресса и функциональных резервов АОС, в итоге приводит к истощению репарационных и адаптационных возможностей организма. В клинике это проявляется множественными осложнениями при лечении заболеваний: когда за успешной коррекцией одного состояния неизбежно идет череда других опасных осложнений, медикаментозная коррекция которых порой является взаимоисключающей.

Интенсификация окисления с участием АФК, расцениваемая как окислительный стресс, может быть проявлением различных процессов происходящих в клетках: интенсификация метаболизма, мобилизация защитных сил, разрушение и гибель клеток. Для адекватной оценки окислительного стресса необходимо динамическое наблюдение за происходящими процессами.

Клиницисту необходимо знать, в какие процессы, происходящие в организме, приходится вмешиваться, и реально оценивать возможные реакции организма. Знание физиологии процесса позволяет выявлять конкретные изменения при различных видах патологии и разрабатывать индивидуальную программу коррекции.

Проведенный анализ литературы показал физиологическую значимость окислительных процессов и позволил сформулировать ряд клинических вопросов:

1. Возможна ли коррекция недостаточности эндогенных антиоксидантов экзогенными препаратами? В каких случаях эффективны антиоксиданты, в каких прооксиданты?
2. Взаимозаменяемы ли анти/прооксиданты различных групп?
3. Как решить вопрос доставки необходимого анти/прооксиданта к конкретным клетками или внутриклеточным структурам?

9. *Davies K.J., Lin S.W., Pacifici R.E.* Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein // *J Biol Chem.* – 1987. – 262(20). – P. 9914–20.
10. *Droge W.* Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // *Physiol Rev.* – 2002. – 82. – P. 47–95.
11. *Dukan S., Farewell A., Ballesteros M. et al.* Protein oxidation in response to increased transcriptional errors // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2000. – 97. – P. 5746–9.
12. *Forman H.J., Fukuto J.M., Torres M.* Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2004. – 287(2). – P. 246–56.
13. *Gaudu P., Weiss B.* SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1996. – 93. – P. 10094–8.
14. *Godon C., Lagniel G., Lee J. et al.* The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae* // *J Biol Chem.* – 1998. – 273. – P. 22480–9.
15. *Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A.* Degradation of oxidized proteins in mammalian cells // *FASEB J.* – 1997. – 11. – P. 526–34.
16. *Haghdoust S., Sjölander L., Czene S., Harms-Ringdahl M.* The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – 41(4). – P. 620–6.
17. *Harman D.* Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // *J Gerontol.* – 1956. – 11. – P. 298–300.
18. *Hehner S.P., Breitkreutz R., Shubinsky G. et al.* Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool // *J Immunol.* – 2000. – 165. – P. 4319–28.
19. *Lambeth J.D.* NOX enzymes and the biology of reactive oxygen // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – 4. – P. 181–9.
20. *Lee I.M., Cook N.R., Manson J.E.* Beta-carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: Women's Health Study // *J Natl Cancer Inst.* – 1999. – 91. – P. 2102–6.
21. *Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G.* Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited // *Pharmacol Ther.* – 2010. – 128(2). – P. 336–74.
22. *Mahadev K., Motoshima H., Wu X. et al.* The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – 24. – P. 1844–54.
23. *Moskovitz J., Oien D.B.* Protein carbonyl and the methionine sulfoxide reductase system // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – 12(3). – P. 405–15.
24. *Musi N., Goodyear L.J.* Insulin resistance and improvements in signal transduction // *Endocrine.* – 2006. – 29(1). – P. 73–80.
25. *Omenn G.S., Goodman G., Thomquist M. et al.* The beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers // *Cancer Res.* – 1994. – 54 (7 Suppl). – P. 2038s–43s.
26. *Pani G., Bedogni B., Colavitti R. et al.* Cell compartmentalization in redox signaling // *IUBMB Life.* – 2001. – 52(1). – P. 7–16.
27. *Pletjushkina O.Y., Fetisova E.K., Lyamzaev K.G. et al.* Long-distance apoptotic killing of cells is mediated by hydrogen peroxide in a mitochondrial ROS-dependent fashion // *Cell Death Differ.* – 2005. – 12(11). – P. 1442–4.
28. *Schafer F.Q., Buettner G.R.* Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – 30. – P. 1191–212.
29. *Schnell N., Krems B., Entian K.D.* The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism // *Curr Genet.* – 1992. – 21. – P. 269–73.
30. *Shah B.H., Catt K.J.* A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy // *Trends Pharmacol Sci.* – 2003. – 24(5). – P. 239–44.
31. *Sies H.* Strategies of antioxidant defense // *Eur J Biochem.* – 1993. – 215. – P. 213–9.
32. *Slund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G.* Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1999. – 96. – P. 6161–5.
33. *Sun H., Tonks N.K.* The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling // *Trends Biochem. Sci.* – 1994. – 19. – P. 480–5.
34. *Thannickal V.J., Fanburg B.L.* Reactive oxygen species in cell signaling // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2000. – 279(6). – P. 1005–28.
35. *Tirosh A., Potashnik R., Bashan N., Rudich A.* Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation // *J Biol Chem.* – 1999. – 274(15). – P. 10595–602.
36. *Wang D., Yu X., Cohen R.A., Brecher P.* Distinct effects of N-acetylcysteine and nitric oxide on angiotensin II-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation and intracellular Ca(2+) levels // *J Biol Chem.* – 2000. – 275(16). – P. 12223–30.
37. *Zheng M., Storz G.* Redox sensing by prokaryotic transcription factors // *Biochem Pharmacol.* – 2000. – 59. – P. 1–6.

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

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

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

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

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

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

При ссылке на тезисы докладов указывают авторов, затем название тезисов конференции, страницы. При ссылке на диссертации или авторефераты указывают автора, затем название диссертации, место и дату написания, страницы. При этом используются следующие сокращения: Дис... канд. мед. наук, Дис... д-ра мед. наук, Авторефер. дис... канд. мед. наук, Авторефер. дис... д-ра мед. наук. Ссылки на интернет-документы следует оформлять так:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 616.71-006.34-033.2:577.175.4

*Н.Н. Семенов, Е.В. Степанова, М.Р. Личиницер***ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИНТЕГРИНОВ  $\alpha_v\beta_3$  И  $\alpha_v\beta_5$ , ПАРАТИРЕОИД-ПОДОБНОГО ГОРМОНА, РЕЦЕПТОРОВ К ПТПГ И ОСТЕОПОНТИНА В РАЗВИТИИ МЕТАСТАЗОВ В КОСТИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПОЧКИ***РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Семёнов Николай Николаевич, канд. мед. наук, старший научный сотрудник отделения химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-92-54, **факс** +7(495)324-27-64**e-mail:** [niksemenov1969@yandex.ru](mailto:niksemenov1969@yandex.ru)

Статья поступила: 21.09.2011, принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

Возможность прогноза развития метастазов в кости становится актуальной в связи с появлением эффективных средств костно-направленной терапии. Цель исследования – оценить прогностическое влияние факторов метастазирования в кости. В исследование были включены 58 больных раком молочной железы и 51 больной раком почки. В первичной опухоли у этих больных иммуногистохимическим методом исследованы некоторые факторы (паратиреоидподобный гормон, рецепторы к ПТПГ, остеопонтин и интегрин  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$ ), ответственные за развитие костных метастазов. Показано, что гиперэкспрессия интегрин  $\alpha_v\beta_3$  при раке молочной железы и почки приводила к статистически значимому раннему и частому развитию костных метастазов. Гиперэкспрессия  $\alpha_v\beta_5$  интегрин при раке молочной железы вызывала более частое и более раннее метастазирование. Экспрессия ПТПГ при раке молочной железы и раке почки также достоверно раньше и чаще приводила к развитию костных метастазов. Установить влияние экспрессии рецепторов к ПТПГ и остеопонтина на частоту и сроки развития костных метастазов не удалось. Таким образом, показана возможность выделить группу больных высокого риска в отношении развития костных метастазов.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, рак почки, метастазы в кости, паратиреоидподобный гормон, интегрин.

*N.N. Semenov, E.V. Stepanova, M.R. Lichinitser***ROLE OF EXPRESSION OF  $\alpha_v\beta_3$  AND  $\alpha_v\beta_5$  INTEGRINS, PARATHYROID HORMONE RELATED PEPTIDE (PTHrP), RECEPTORS TO PTHrP, OSTEOPONTINE, IN BONE METASTASIS PROGRESSION IN BREAST AND KIDNEY CANCER***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

The prognosis for the development of metastases in the bone becomes important with the advent of effective drugs of bone-directed therapy. The aim of the study was to evaluate the prognostic value of factors, which promotes bone metastases. The study included 58 patients with breast cancer and 51 patients with kidney cancer. In the primary tumor by immunohistochemistry we investigate parathyroid hormone related peptide, receptors to PTHrP, osteopontine,  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  integrins, responsible for the development of bone metastases. It is shown that overexpression of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in breast and kidney cancer led to a statistically significant early and frequent development of bone metastases. Overexpression of  $\alpha_v\beta_5$  integrin in breast cancer causes more frequent and earlier metastasis. The expression of PTHrP in breast and kidney cancer was also significantly early and often led to the development of bone metastases. Influence the expression of receptors to PTHrP and osteopontine on the frequency and timing of the development of bone metastases failed. Thus, we show the possibility to allocate a group of patients with high risk in relation to the development of bone metastases.

**Key words:** breast cancer, kidney cancer, bone metastases, parathyroid hormone related peptide, integrins.

**Введение**

Способность опухоли к развитию метастазов является основной причиной смертности от злокачественных новообразований. Возможности профилактики развития метастазов после удаления первичной опухоли ограничены считанным количеством опухолей и являются крайне неспецифичными, за исключением профилактики метастазов при раке молочной железы. Однако даже при определении тактики лечения при профилактике метастазов рака молочной железы обычно ориентируются на имеющиеся лекарственные возможности, а

не на понимание природы развития метастазов. До настоящего времени нет четкого объяснения, почему опухоли положительные по рецепторам эстрогена/прогестерона преимущественно метастазируют в кости, а опухоли положительные по HER2/neu – в печень и головной мозг. Также нет четкого объяснения и другим фактам: например, преимущественное метастазирование в печень при меланоме глаза, развитие метастазов в надпочечниках при раке легкого, и т.д. В отношении костных метастазов существует ряд факторов, экспрессия которых на опухолевой клетке коррелирует как с колонизацией, так и с развитием метастазов.

Это интегрин, позволяющие опухолевым клеткам связываться с костным матриксом, костный сиалопротеин и остеопонтин, являющиеся лигандами к интегрину и действующие в триаде с интегринными и матриксной металлопротеиназой-2.

Также к факторам, способствующим развитию костных метастазов, относят ПТПГ и его рецепторы ПТПР, активизирующие резорбцию кости, что высвобождает из матрикса трансформирующий фактор роста  $\beta$ , стимулирующий рост опухоли, вызывая так называемый «замкнутый круг» костного метастазирования.

ПТПГ экспрессируется в метастазах в значительно больших количествах, чем в первичной опухоли. Если секреция ПТПГ выявляется в 60 % случаев первичных опухолей, то в костных метастазах – в 92 %, а в висцеральных метастазах – только в 17 % [8].

В целом, на сегодня показано, что экспрессия ПТПГ первичной опухолью может быть связана с возможностью развития в дальнейшем костных метастазов и напрямую определяет распространенность костных метастазов и их способность к литической деструкции. В то же время повышенный уровень экспрессии ПТПГ сочетается с хорошим прогнозом для выживаемости [5].

Интегрины – большое семейство белков, обеспечивающих связывание клеток с внеклеточными элементами, а также их миграцию. Они представляют собой гетеродимер, состоящий, соответственно из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей. Известны 25 белков-димеров, которые образованы из 18  $\alpha$ -цепей и 8  $\beta$ -цепей. Гиперэкспрессия некоторых интегринов отмечается на некоторых опухолевых клетках (рак молочной, щитовидной, предстательной железы, легкого, почки), что связывают с их способностью развиваться в дальнейшем метастазы в костях [4]. При обсуждении метастазирования в костях большое внимание уделяется 2 интегрину –  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$ , которые связываются с белками костного матрикса (костный сиалопротеин, фибронектин, фактор фон Виллебранда, витронектин, тромбоспондин, коллаген и ламинин), обеспечивая динамическое взаимодействие клеток и внеклеточного матрикса [6]. В норме  $\alpha_v\beta_3$  интегрин выявляется на клетках эндотелия, гладкомышечных клетках, остеокластах и тромбоцитах. Взаимодействие  $\alpha_v\beta_3$  интегрин с его лигандами ведет к резкому усилению неопластического роста. В условиях опухоли гиперэкспрессия этого интегрин обеспечивает преимущественное метастазирование в кости. Интегрины позволяют метастазирующим опухолевым клеткам прикрепляться к элементам костного матрикса. Коэкспрессия интегринов и костного сиалопротеина еще более усиливала способность опухоли к метастазированию в кости [12].

Еще одним маркером, связанным с метастазированием в кости, возможно, является остеопонтин. Остеопонтин представляет собой фосфорилированный гликопротеин экстрацеллюлярного матрикса. В норме он экспрессируется клетками поджелудочной железы, желчного пузыря, бронхов, молочной железы, слюнными железами. Также определяется в сыворотке крови, в моче и т.д. В костной ткани остеопонтин секретируется остеобластами и остеокластами и отвечает за межклеточное взаимодействие и взаимодействие клеточных элементов с внеклеточным матриксом [10]. Экспрессия остеопонтина различными опухолевыми клетками коррелировала со стадией болезни, экспрессией HER/2neu, p53 и рецепторами прогестерона. В целом экспрессия выявляется у 60 % больных раком молочной железы. Пациенты, негативные по экс-

прессии остеопонтина, имели выживаемость более 228 мес. в сравнении с 67 мес. у больных с его гиперэкспрессией. Гиперэкспрессия остеопонтина предсказывает как общую выживаемость больных, так и вероятность развития костных метастазов [9].

Таким образом, в настоящее время определены некоторые факторы, наличие которых в опухоли может приводить к развитию метастазов в кости. В то же время не ясно, одинаковы ли их значения для различных типов опухолей.

Мы оценили значимость для костного метастазирования некоторых молекулярно-биологических маркеров и при двух несхожих опухолях – раке молочной железы и почки.

## Материалы и методы

### Пациенты

В анализ молекулярно-биологических маркеров были включены 58 больных раком молочной железы и 51 больной раком почки, получавшие лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Больные имели метастазы только в кости, метастазы в кости в сочетании с внекостными метастазами, только внекостные метастазы и не имели метастазов к окончанию наблюдения. Характеристики больных представлены в табл. 1 и 2

Проведен анализ клинического течения болезни и экспрессии маркеров в ткани опухоли. Оценивалось время до развития костных метастазов после операции и частота развития костных метастазов.

### Иммуногистохимический анализ

Проведено изучение экспрессии ПТПГ, рецепторов к ПТПГ, остеопонтина, интегринов  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$  в первичной опухоли (рак молочной железы и рак почки). Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Используемые в работе первичные антитела и их разведения представлены в табл. 3. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов проводили прогревание срезов на водяной бане в предварительно нагретом до 95–99 °С соответствующем буфере в течение 40 мин. Затем стекла охлаждали при комнатной температуре в течение 15–20 мин и переносили в фосфатный буфер на 5 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 5 мин в темноте с 3%-ной перекисью водорода, приготовленной на дистиллированной воде, а затем промывали 5 мин в фосфатном буфере. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 мин с 1 %-ным раствором бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию с первичными антителами проводили при 4 °С в течение 16–18 ч. После первичных антител стекла промывали 2 раза по 5 мин в фосфатном буфере. Инкубацию со вторыми антителами, мечеными пероксидазой (ENVISION+ kit, DAKO), проводили при комнатной температуре в течение 20 мин, и затем срезы промывали 2 раза по 5 мин. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали DAB+ систему (DAKO). Реакцию проводили в темноте в течение 5–10 мин. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в синтетическую основу. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «NIKON 80i» (Германия) под увеличением  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ .

Таблица 1

Характеристика 58 больных раком молочной железы

Характеристика больных	Число больных, %
Стадия болезни	
I	0
II	17,2
III	82,8
IV	0
Локализация метастазов (при первом рецидиве)	
Только кости	55,2
Кости + другие зоны	12
Некостные метастазы	12
Без метастазов	20,7
РЭ/РП положительные	36,2
РЭ/РП отрицательные	13,8
РЭ/РП неизвестные	50
Возраст больных – 50 лет	

Таблица 2

Характеристика 51 больного раком почки

Характеристика больных	Число больных, %
Стадия	
I	0
II	39,2
III	3,9
IV	37,3
Неизвестна	19,6
Локализация метастазов (при первом рецидиве)	
Только кости	39,2
Кости + другие зоны	17,6
Некостные метастазы	17,6
Без метастазов	23,5
Возраст больных – 55,9 лет	

Таблица 3

Панель использованных в исследованиях антител

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
ПТПГ	PTH-rP (1D1)	Santa Cruz Biotech	1:100	10 мМ цитратный буфер (рН 6,0)
Рецепторы к ПТПГ	PTH/PTHrP-R (3D1.1)	Santa Cruz Biotech	1:400	10 мМ цитратный буфер (рН 6,0)
Остеопонтин	Поликлон	Neomarkers	1:100	10 мМ цитратный буфер (рН 6,0)
Интегрин $\alpha_v\beta_3$	Integrin $\alpha_v\beta_3$ (23C6)	Santa Cruz Biotech	1:50	10 мМ цитратный буфер (рН 6,0)
Интегрин $\alpha_v$	313.6F8	Calbiochem	–	10 мМ цитратный буфер (рН 6,0)
Интегрин $\beta_5$	343.11D1	Calbiochem	–	10 мМ цитратный буфер (рН 6,0)

Таблица 4

Выраженность экспрессии маркеров при раке молочной железы и раке почки

Уровень экспрессии	ПТПГ	Рецепторы ПТПГ	Остеопонтин	Интегрин $\alpha_v\beta_3$	Интегрин $\alpha_v\beta_5$
Рак молочной железы, n=58					
0 баллов	43	5	9	34	33
1 балл	4	0	12	13	7
2 балла	4	14	13	5	9
3 балла	7	39	24	6	9
Рак почки, n=51					
0 баллов	40	19	5	43	40
1 балл	5	7	5	5	4
2 балла	2	10	12	2	6
3 балла	4	5	29	1	1

Таблица 5

Значение экспрессии  $\alpha_v\beta_3$  интегрин при раке молочной железы и раке почки

Рак молочной железы			
Характеристика костных метастазов	$\alpha_v\beta_3$ отрицательный, n=52	$\alpha_v\beta_3$ положительный, n=6	p
Медиана времени до костных метастазов, мес.	34,5	8,1	0,02
Число больных с костными метастазами, %	63	100	0,07
Рак почки			
Характеристика костных метастазов	$\alpha_v\beta_3$ отрицательный, n=43	$\alpha_v\beta_3$ положительный, n=8	p
Медиана времени до костных метастазов, мес.	82,2	8,5	0,001
Число больных с костными метастазами, %	48,8	100	нз

Таблица 6

Значение экспрессии  $\alpha_v\beta_5$  интегрин при раке молочной железы и почки

Рак молочной железы			
Характеристика костных метастазов	$\alpha_v\beta_5$ отрицательный, n=49	$\alpha_v\beta_5$ положительный, n=9	p
Медиана времени до костных метастазов, мес.	40,6	7,1	0,003
Пропорция больных с костными метастазами, %	62,5	100	0,03
Рак почки			
Характеристика костных метастазов	$\alpha_v\beta_5$ отрицательный, n=44	$\alpha_v\beta_5$ положительный, n=7	p
Медиана времени до костных метастазов, мес.	37,2	3	0,02
Пропорция больных с костными метастазами, %	56,8	57	нз

Таблица 7

Значение экспрессии ПТПГ при раке молочной железы и почки

Рак молочной железы			
Характеристика костных метастазов	ПТПГ отрицательный, n=48	ПТПГ положительный, n=10	p
Медиана времени до костных метастазов, мес.	40,6	19,3	0,03
Пропорция больных с костными метастазами, %	69,1	40	0,01
Рак почки			
Характеристика костных метастазов	ПТПГ отрицательный, n=45	ПТПГ положительный, n=6	p
Медиана времени до костных метастазов, мес.	128,9	37,3	нз
Пропорция больных с костными метастазами, %	11	66,7	0,001

Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество.

Критерии оценки результатов окрашивания были взяты из литературных источников. В работе использованы следующие критерии оценки молекулярно-биологических маркеров и разделения опухолей на положительные или отрицательные по их экспрессии:

1) Экспрессия ПТПГ оценивалась по балльной системе в зависимости от общего количества положительных опухолевых клеток с цитоплазматическим окрашиванием:

- 0 – отсутствие окрашивания,
- 1<sup>+</sup> – менее 10 % окрашенных клеток,
- 2<sup>+</sup> – 10–49 % окрашенных клеток,
- 3<sup>+</sup> – более 50 % положительных клеток [3].

Также оценивалась экспрессия в зависимости от интенсивности окрашивания:

- 0 – отсутствие окрашивания,
- 1<sup>+</sup> – слабое сомнительное окрашивание,
- 2<sup>+</sup> – среднее четкое окрашивание,
- 3<sup>+</sup> – сильное четкое окрашивание [1; 7].

2) Экспрессия рецепторов к ПТПГ оценивалась по балльной системе в зависимости от общего количества положительных опухолевых клеток с цитоплазматическим окрашиванием:

- 0 – отсутствие окрашивания,
- 1<sup>+</sup> – менее 25 % окрашенных клеток,
- 2<sup>+</sup> – 25–49 % окрашенных клеток,
- 3<sup>+</sup> – более 50 % положительных клеток [11].

3) Экспрессия остеопонтина оценивалась по балльной системе в зависимости от общего количества положительных опухолевых клеток с цитоплазматическим окрашиванием:

- 0 – отсутствие окрашивания,
- 1<sup>+</sup> – менее 10 % окрашенных клеток,
- 2<sup>+</sup> – 10–49 % окрашенных клеток,
- 3<sup>+</sup> – более 50 % положительных клеток.

Также оценивалась экспрессия в зависимости от интенсивности окрашивания:

- 0 – отсутствие окрашивания,
- 1<sup>+</sup> – слабое сомнительное окрашивание,
- 2<sup>+</sup> – среднее четкое окрашивание,
- 3<sup>+</sup> – сильное четкое окрашивание [2; 9].

4) Экспрессия  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$  интегринов оценивалась по балльной системе в зависимости от общего количества положительных опухолевых клеток с цитоплазматическим окрашиванием:

- 0 – отсутствие окрашивания,
- 1<sup>+</sup> – менее 10 % окрашенных клеток,
- 2<sup>+</sup> – 10–49 % окрашенных клеток,
- 3<sup>+</sup> – более 50 % положительных клеток.

Также оценивалась экспрессия в зависимости от интенсивности окрашивания:

- 0 – отсутствие окрашивания,
- 1<sup>+</sup> – слабое сомнительное окрашивание,
- 2<sup>+</sup> – среднее четкое окрашивание,
- 3<sup>+</sup> – сильное четкое окрашивание.

#### Статистический анализ

Оценка выживаемости и других временных параметров в различных группах проводилась тестом log-rank методом Каплан-Мейера. Оценка категориальных переменных в различных группах (частота развития костных метастазов и т.п.) проводилась непараметрическими методами. Различия в показателях в изучаемых группах считались значимыми при  $p < 0,05$ .

Статистическая обработка полученных материалов проводилась с использованием программ Statistica v6 и SPSS 11.0.

#### Результаты

Для оцениваемых в данном исследовании маркеров число включенных случаев невелико, что не позволяет однозначно определить, какая выраженность их экспрессии имеет отражение в клиническом течении костных метастазов. Поэтому была оценена клиническая значимость всех возможных вариантов экспрессии маркеров: отсутствие экспрессии (0 баллов) против любой степени экспрессии (1; 2; 3 балла), 0 и 1 балл против 2 и 3 баллов (умеренная против сильной) и 0; 1; 2 балла против 3 баллов (гиперэкспрессии). Будут представлены только результаты, имевшие клиническую значимость. В табл. 4 представлена частота и выраженность экспрессии каждого изучавшегося маркера при раке молочной железы и почки. Показано, что при раке молочной железы экспрессия (1–3 балла) ПТПГ встречается у 26 % больных, в то время как экспрессия рецепторов к нему у 91,4 %.

Равным образом и экспрессия интегрина  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$  в первичной опухоли молочной железы встречалась у 37,9 и 43,1 % соответственно, а остеопоптин – у 84,4 %. При раке почки отмечена сходная частота: ПТПГ экспрессирован в 21,6 % случаев, рецепторы к нему в 43 %. Интегрины  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$  экспрессированы в 15,8 и 21,6 % случаев соответственно, а остеопоптин в 90,2 % случаев.

#### **Значимость интегрина $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ для метастазирования в кости**

При исследовании экспрессии интегрина  $\alpha_v\beta_3$  при раке молочной железы значимой оказалась гиперэкспрессия (3 балла), а при раке почки – напротив, отсутствие экспрессии в сравнении с любым её уровнем (табл. 5).

Оказалось, что наличие экспрессии интегрина  $\alpha_v\beta_3$  вело к значительному уменьшению времени развития метастазов и увеличению частоты развития метастазов в кости при раке молочной железы и раке почки. Исследования экспрессии интегрина  $\alpha_v\beta_5$  также показали: имела значение сильная экспрессия (2 и 3 балла), что оказывало выраженное влияние на время до появления метастазов в костях, частоту поражения скелета (табл. 6).

#### **Значимость ПТПГ для метастазирования в кости**

При оценке влияния экспрессии ПТПГ было установлено, что при раке молочной железы и при раке почки клиническое значение имеет сильная (2 и 3 балла) экспрессия (табл. 7).

Результаты оценки оказались несколько неожиданными при раке молочной железы, так как экспрессия ПТПГ, хотя и была связана с уменьшением времени до развития костных метастазов, в то же время они развивались у меньшего числа больных. При раке почки экспрессия ПТПГ сочеталась как со значительным уменьшением времени до развития метастазов, так и со значительным увеличением частоты развития метастазов в кости. При оценке клинического значения экспрессии рецепторов к ПТПГ и остеопоптина не было найдено никакой взаимосвязи с прогнозом костного метастазирования как у больных раком молочной железы, так и раком почки.

#### **Литература**

1. Bryden A.A.G., Islam S., Freemont A.J. et al. Parathyroid hormone-related peptide: expression in prostate cancer bone metastases // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. – 2002. – 5. – P. 59–62.
2. Coppola D., Szabo M., Boulware D. et al. Correlation of Osteopontin Protein Expression and Pathological Stage across a Wide Variety of Tumor Histologies // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – 10. – P. 184–90.
3. Fukunishi H., Nobuyuki Y., Kazuo M. et al. Immunohistochemical study on the expression of parathyroid hormone-related protein in ovarian tumors // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. – 1994. – 12. – Suppl. 1.
4. Jin H., Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets // *Br J Cancer*. – 2004. – 90(3). – P. 561–5.
5. Kominsky S.L., Davidson N.E. A “bone” fide predictor of metastases? Predicting breast cancer metastases to the bone // *J Clin Oncol*. – 2006. – 24. – P. 2227–9.
6. Lu X., Lu D., Scully M., Kakkar V. The role of integrins in cancer and the development of anti-integrin therapeutic agents for cancer therapy // *Perspect Medicin Chem*. – 2008. – 2. – P. 57–73.
7. MacLennan G., Farrow G.M., Bostwick D.G. Immunohistochemistry in the evaluation of renal cell carcinoma // *J Urol Pathol*. – 1997. – 6. – P. 195–203.
8. Powell G.J., Southby J., Danks J.A. et al. Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites // *Cancer Res*. – 1991. – 51. – P. 3059–61.
9. Rudland P.S., Platt-Higgins A., El-Tanani M. et al. Prognostic Significance of the Metastasis-associated Protein Osteopontin in Human Breast Cancer // *Cancer Res*. – 2002. – 62. – P. 3417–27.
10. Standal T., Borset M., Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling // *Exp Oncol*. – 2004. – 26(3). – P. 179–84.
11. Suzuki Y., Tokuda Y., Saito Y. et al. Clinicopathological correlation between expression of PTHrP receptor and various prognostic factors in breast cancer without axillary lymph node metastasis // *Tokai J Exp Clin Med*. – 2005. – 30(2). – P. 127–32.
12. Taverna D., Crowley D., Connolly M. et al. A Direct Test of Potential Roles for  $\alpha_3$  and  $\alpha_5$  Integrins in Growth and Metastasis of Murine Mammary Carcinomas // *Cancer Res*. – 2005. – 65. – P. 10324–9.

#### **Обсуждение**

Мы предположили, что для колонизации костей не столько важен тип опухоли, сколько характеристики опухолевых клеток, способствующие успешному развитию костных метастазов. Также было существенным определить, какие характеристики опухолевых клеток наиболее способствуют развитию метастазов. При анализе молекулярно-биологических маркеров оказалось, что для развития метастазов этих несхожих опухолей в костях значимыми являлись одни и те же маркеры, к которым относились ПТПГ и интегрины. Интересно, что экспрессия интегрина в опухолях молочной железы отмечалась в 2 раза чаще, чем в опухолях почки, что соответствовало частоте развития костных метастазов (60–70 % при раке молочной железы против 30 % при раке почки). Очевидно, что недостаточное количество наблюдений не позволяет делать однозначные выводы, однако сам факт совпадения молекулярно-биологических маркеров в разных опухолях как факторах прогноза, открывает новые возможности для выделения групп больных с разными локализациями первичной опухоли в отношении прогноза для развития костных метастазов. Ранее такого рода сравнительных исследований не проводилось. В целом, возможность профилактики метастазов в костях является актуальной клинической проблемой. Повышенную активность костного обмена как одну из причин костного метастазирования в настоящее время можно успешно контролировать применением бифосфонатов, и результаты двух исследований по адъювантному применению Клодроната, а также серия аналогичных исследований, проводящихся в настоящее время, демонстрируют обоснованность такого подхода. В то же время определение характеристик первичной опухоли, способствующих развитию костных метастазов, позволит более четко определить число больных, нуждающихся в дополнительном лечении. Полученные нами результаты показывают, что для определения больных с высоким риском развития костных метастазов, независимо от типа опухоли, необходимо определение одних и тех же маркеров. С учетом того, что в настоящее время разрабатываются лекарства и против ПТПГ, и против интегрина, такое таргетирование групп высокого риска особенно значимо.

*Работа поддержана грантом  
Правительства Москвы.*

# Содержание Российского Биотерапевтического Журнала за 2011

## № 1-2011

Материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 22–23 марта 2011 г. <b>ТЕЗИСЫ</b> .....	3-74
Рабочий семинар МНТЦ. <b>ТЕЗИСЫ</b> .....	74-82
АКАДЕМИК РАМН В. И. ШВЕЦ. К 75-летию со дня рождения.....	83-84
<b>Правила оформления статей</b> .....	85-87
<b>Список сокращений</b> .....	88

УДК 615.012:577.175.3

А.Н. Балаев<sup>1</sup>, В.Н. Осипов<sup>2</sup>, К.А. Охманович<sup>1</sup>, В.Е. Фёдоров<sup>1</sup>, Е.В. Решетников<sup>1</sup>**ПОЛУЧЕНИЕ Н-PHE-D-TRP-LYS(ε-ВОС)-THR-OME****– ТЕТРАПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА СИНТЕЗА АНАЛОГОВ СОМАТОСТАТИНА**<sup>1</sup>ЗАО «Фарм-Синтез», Москва<sup>2</sup>РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация:**

Осипов Василий Николаевич, старший научный сотрудник НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел: +7(495)324-19-09

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

Статья поступила: 19.04.2011; принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

Разработан новый простой, эффективный и легко масштабируемый метод получения Н-Phe-D-Trp-Lys(ε-Вос)-Thr-ОМе – ключевого тетрапептидного фрагмента синтеза аналогов соматостатина.

**Ключевые слова:** интермедиат для аналогов соматостатина, октреотид, цифетрелин.

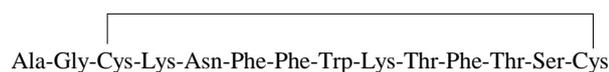
A.N. Balaev,<sup>1</sup> V.N. Osipov<sup>2</sup>, K.A. Okhmanovich<sup>1</sup>, V.E. Fedorov<sup>1</sup>, E.V. Reshetnikov<sup>1</sup>**PREPARATION H-PHE-D-TRP-LYS(ε-ВОС)-THR-OME****– TETRAPEPTIDE INTERMEDIATE FOR SOMATOSTATINE ANALOGS SYNTHESIS**<sup>1</sup>CJSC «Pharm-Sintez», Moscow<sup>2</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

Effective and large scale method for preparation H-Phe-D-Trp-Lys(ε-Вос)-Thr-ОМе – key tetrapeptide intermediate for somatostatine analogs synthesis was developed.

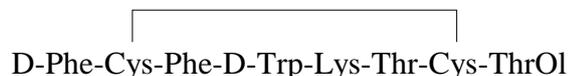
**Key words:** intermediate for somatostatine analogs, oktreotide, cifetrelina.

**Введение**

Способность Соматостатин – пептидный гормон, состоящий из 14 аминокислотных остатков:



Соматостатин угнетает секрецию гормона роста, пролактина, тиреотропного гормона гипофизом, инсулина и глюкагона в поджелудочной железе, а также секрецию гастрина и секретина в желудочно-кишечном тракте, то есть, гормонов, стимулирующих пролиферацию опухолевых клеток. В связи с этим соматостатин является весьма перспективным при лечении опухолевых заболеваний и акромегалии. Однако широкий спектр физиологической активности и кратковременность биологического действия препятствует его использованию в медицине. Представляет интерес получение аналогов соматостатина, обладающих большей избирательностью и продолжительностью действия. Наиболее распространен и известен Октреотид (Сандостатин), который является синтетическим аналогом соматостатина со сходными с ним фармакологическими эффектами и значительно большей продолжительностью действия:



Он подавляет патологически повышенную секрецию гормона роста, пептидных гормонов и серотонина, продуцируемых в гастроэнтеропан-

креатической эндокринной системе, при этом его применение не сопровождается гиперсекрецией гормонов по механизму отрицательной обратной связи.

В настоящее время Октреотид нашел широкое применение при лечении острого панкреатита, профилактике и лечении осложнений после операций на поджелудочной железе, в терапии акромегалии, а также как средство патогенетической терапии при опухолях, активно экспрессирующих рецепторы к соматостатину.

Исследования последних лет показали, что и более короткие пептиды могут обладать сопоставимым с Октреотидом физиологическим действием. Так, ряд новых производных пентапептида, Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-ОМе, синтезированных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина, при сравнительных исследованиях на животных совместно с Сандостатином обладали равной с ним противоопухолевой активностью [1]. Один из них отобран в эксперименте для продвижения на клинические испытания [2].

Целью настоящей работы является разработка простого и масштабируемого способа получения Н-Phe-D-Trp-Lys(ε-Вос)-Thr-ОМе, используемого для получения пептидов – синтетических аналогов соматостатина.

**Материалы и методы**

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы Shimadzu. Колонка: Grom-Sil 12J ODS-4HE, 5μm, 250-4,6 mm. Условия: А – вода + фосфатный буфер pH 3, В – ацетонитрил, градиент 20 % В (0 мин) 60 % В (10 мин) 70 % В (15 мин) 70 % В (30 мин). ТСХ проводили на пластинах Merck TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, проявление ninгидрином.

Гидрохлорид метилового эфира L-треонина [3], N<sup>ε</sup>-трет-бутоксикарбонил-L-лизин [6], F-комплекс [4] и N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланил-D-триптофан [5] получены известными методами.

#### *Z-Phe-D-Trp-OPfp (II)*

Растворяют 35 г (72 ммоль) *Z-Phe-D-Trp-OH* в смеси 20 мл диметилформаида и 170 мл диоксана. При перемешивании присыпают 70 г (92 ммоль) F-комплекса. Перемешивают 3 ч при комнатной температуре. Отфильтровывают выпавшую дициклогексилмочевину, промывают смесью 50 мл диоксана и 5 мл диметилформаида. В фильтрат добавляют 400 мл гексана и оставляют на ночь при 5 °С. Фильтруют выпавший продукт и промывают его на фильтре смесью 100 мл гексана. Осадок сушат на воздухе до постоянного веса. Получают 39 г (83 %) белого кристаллического продукта. ТСХ:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  9/1/0,1;  $R_f(\text{II})=0,89$ .

#### *Z-Phe-D-Trp-Lys(ε-Вос)-OH (III)*

К суспензии 50 г (76,7 ммоль) *Z-Phe-D-Trp-OPfp* в 300 мл диоксана при перемешивании (температура 24–25 °С) прикапывают в течение 3 мин раствор *N-Lys(ε-Вос)OH* (приготовленный растворением 20 г (81,2 ммоль) 95 %-ого *N-Lys(ε-Вос)-OH* и 1 г имидазола в 80 мл 1 N водного раствора гидроксида натрия). Реакционную массу перемешивают в течение 1,5–2 ч. Прозрачный раствор промывают в делительной воронке 2 раза по 300 мл гексаном, разбавляют 350 мл воды и затем 200 мл гексана. Выпавшую натриевую соль трипептида отфильтровывают, перемешивают с 50 мл 5 %-ого водного раствора лимонной кислоты и отфильтровывают осадок. Промывают 500 мл воды и сушат на воздухе до постоянного веса. Получают 44 г (80,3 %) белого аморфного продукта **III**. ТСХ:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  9/1/0,1;  $R_f(\text{III})=0,71$ . Содержание основного вещества 94,3 % (ВЭЖХ).

#### *Z-Phe-D-Trp-Lys(ε-Вос)-Thr-OMe (IV)*

Растворяют последовательно в 100 мл диметилформаида 25 г (35 ммоль) *Z-Phe-D-Trp-Lys(ε-Вос)OH*, 5,8 г (38 ммоль) *NOBt* моногидрата, 6,3 г (37 ммоль) *N-Thr-OMe · HCl* и 4 г (40 ммоль) триэтиламина. Охлаждают смесь до 0–5 °С и при этой температуре и перемешивании прикапывают в течение 5 мин раствор 7,5 г (37 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 25 мл диметилформаида.

Реакционную массу перемешивают при этой же температуре 1 ч, снимают охлаждение и оставляют при комнатной температуре на 12 ч (контроль по ТСХ). Выпавшие кристаллы мочевины отфильтровывают, промывают 20 мл диметилформаида и тщательно отжимают.

Фильтрат разбавляют водой до 1 л и оставляют на 30 мин. Воду сливают с выпавшего густого масла и промывают его взбалтыванием с 200 мл воды. Растворяют масло в 500 мл хлороформа и полученный раствор последовательно промывают 2 раза 700 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия, 1000 мл 5 %-ого водного раствора лимонной кислоты и затем 1000 мл воды.

Органический слой сушат сульфатом натрия, отгоняют растворитель на роторном испарителе (<40 °С), полученное вязкое масло затирают с 200 мл петролейного эфира.

Осадок отфильтровывают и промывают на фильтре 100 мл петролейного эфира. Осадок сушат на воздухе до постоянного веса. Получают 27,3 г (94,1 %) белого мелкого порошка **IV**. ТСХ:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  9/1/0,1;  $R_f(\text{IV})=0,76$ . Содержание основного вещества 94,5 % (ВЭЖХ).

#### *N-Phe-D-Trp-Lys(ε-Вос)-Thr-OMe (V)*

Растворяют в 370 мл метанола 37 г (44,6 ммоль) *Z-Phe-D-Trp-Lys(ε-Вос)-Thr-OMe* и в полученный раствор добавляют 0,3 г 20 %-ной водной пасты гидроксида палладия.

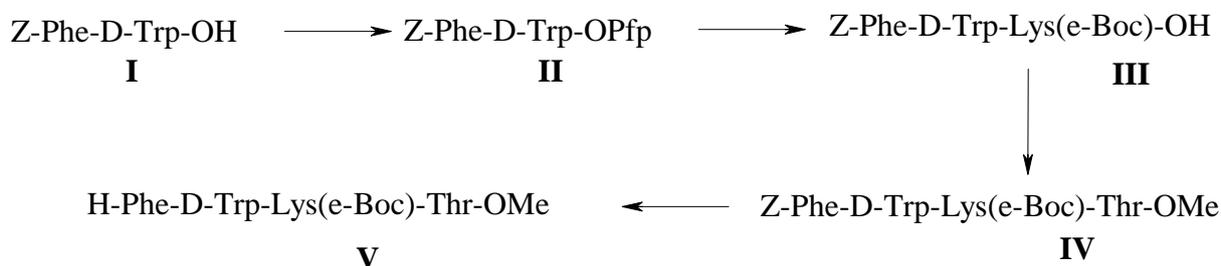
При интенсивном перемешивании и комнатной температуре пропускают водород (5–8 ч, контроль по ТСХ). Отфильтровывают палладий, отгоняют метанол на роторном испарителе (<40 °С), к остатку добавляют 50 мл серного эфира, перемешивают и добавляют 200 мл петролейного эфира.

Выпавший осадок фильтруют, промывают на фильтре 50 мл петролейного эфира и сушат на воздухе до постоянной массы.

Получают 27,4 г (88,3 %) светло-серого мелкокристаллического порошка. ТСХ:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  9/1/0,1;  $R_f(\text{V})=0,18$ . Содержание основного вещества 96,9 % (ВЭЖХ).

#### Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов разработан и оптимизирован метод получения тетрапептида (**V**). Схема синтеза включает 4 стадии:



На первой стадии из N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланил-D-триптофана (**I**) получают пентафторфениловый эфир (**II**). В качестве реагента используют аддукт пентафторфенола и пентафторфенилового эфира дициклогексизомочевины (F-комплекс). Как показано в [4], его использование позволяет получать пентафторфениловые эфиры пептидов в очень мягких условиях без рацемизации исходного пептида. Реакцию проводят при комнат-

ной температуре в смеси растворителей диметилформаид-диоксан. Полученный **II** высаживают из реакционной массы гексаном. Взаимодействие **II** с N<sup>ε</sup>-трет-бутоксикарбонил-L-лизином в водно-диоксановом растворе в присутствии гидроксида натрия приводит к образованию натриевой соли трипептида (**III**), которую переводят в свободную кислоту **III** обработкой 5 %-ным водным раствором лимонной кислоты.

Конденсацией **III** с метиловым эфиром L-треонина (карбодиимидный метод с использованием гидроксibenзотриазола (HOBt)) в диметилформамиде при 0–5°C получают тетрапептид (**IV**). Необходимо отметить, что в этой схеме треонин используется без защиты гидроксильной группы боковой цепи, что не мешает дальнейшему синтезу цифретрелина и октреотида.

Целевое соединение **V** получают гидрированием **IV** водородом на палладиевом катализаторе. В качестве катализатора гидрирования использовали свежеприготовленную 20 %-ную водную пасту гидроксид палладия. Гидрирование проводили при комнатной температуре с использованием метилового спирта в качестве растворителя.

### Литература

1. Смирнова Л.И., Устинкина С.В., Смирнова А.П. и др. Средство, обладающее противоопухолевым действием. Патент РФ RU2254139. 20.06.2005. Бюл. №17.
2. Смирнова А.П., Сушилина Л.П., Устинкина С.В. и др. Синтез и противоопухолевая активность цифретрелина при пероральном введении // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 18.
3. Gu K., Bi L., Zhao M. et. al. Toward the development of chemoprevention agents. Part 1: Design, synthesis, and anti-inflammatory activities of a new class of 2,5-disubstituted-dioxacycloalkanes // Bioorg. Med. Chem. – 2007. – 15(14). – P. 4775–99.
4. Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M.Q. On the Optical Purity of Peptide Active Esters Prepared by N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide and «Complexes» of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-Pentachlorophenol and N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-Pentafluorophenol // J. Am. Chem. Soc. – 1967. – 89(1). – P. 183–4.
5. Nicolaidis E.D., De Wald H.A., Westland R.D. et. al. Potential antiviral agents. Carbobenzoxy di- and tripeptides active against measles and herpes viruses // J. Med. Chem. – 1968. – 11(1). – P. 74–9.
6. Wijek S., Masiukiewicz E., Rzeszotarska B. A Large Scale Synthesis of Mono- and Di-urethane Derivatives of Lysine // Chem. Pharm. Bull. – 1999. – 47(10). – P. 1489–90.

Разработанный способ синтеза **V** позволяет получать целевое соединение (и промежуточные пептиды) с высоким выходом и чистотой 96–98 % без использования хроматографической очистки.

### Выводы

В результате проделанной работы разработан и внедрен в производство новый способ получения тетрапептида N-Phe-D-Trp-Lys( $\epsilon$ -Boc)-Thr-OMe как ключевого фрагмента синтеза аналогов соматостатина. Предложенный способ отличается простотой, минимальным количеством стадий и позволяет получать целевой тетрапептид в промышленном масштабе.

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





## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

*К.В. Сытенкова, Н.И. Поспехова, И.В. Поддубная, Л.Н. Любченко*

**КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОМ И СПОРАДИЧЕСКОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....3**

*Л.И. Короленкова, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников*

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АДГЕЗИИ, УТРАТЫ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ СВЯЗЕЙ, ИНВАЗИИ И НЕОАНГИОГЕНЕЗА КАК ФАКТОРЫ ПРОГРЕССИИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И РШМ.....13**

*К.А. Скрышник, В.С. Косоруков*

**ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ГРАНУЛОЦИТАРНЫЙ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.....19**

*Н.Л. Шимановский, В.Н. Кулаков, Е.Ю. Григорьева, А.А. Липенгольц*

**НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ.....25**

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Ю.А. Рагулин, М.А. Каплан, В.Н. Медведев, Н.В. Афанасова, В.Н. Капинус*

**СОЧЕТАННАЯ ФДТ И ЛТ В ЛЕЧЕНИИ РАКА ЛЕГКОГО.....33**

*Я.А. Каинов, И.А. Фаворская, Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова, А.В. Комельков, Е.М. Чевкина*

**РОЛЬ БЕЛКА SRBP1 В ФОРМИРОВАНИИ ВЫСОКОМЕТАСТАЗНОГО ФЕНОТИПА RSV-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ СИРИЙСКОГО ХОМЯКА.....37**

*В.Л. Каранетян, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, С.О. Никогосян, В.В. Кузнецов*

**ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА (P53, BCL-2, BAX) И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКОВ РАННИХ СТАДИЙ.....45**

*К.С. Титов, М.В. Киселевский, Л.В. Демидов, В.Ю. Сельчук, А.Н. Грицай, Э.Х. Кучмезов*

**ВНУТРИБЮШИННАЯ БИОТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И ДОНОРСКИХ ЛАК-КЛЕТОК ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКИХ АСЦИТАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ.....51**

*Н.А. Пятаев, П.И. Скопин, О.В. Минаева, С.А. Щукин, Е.Ю. Коровина, Н.Н. Зыряева*

**ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ДОКСОРУБИЦИНА ПРИ ВВЕДЕНИИ В ФОРМЕ КОНЬЮГАТА С ДНК У КРЫС С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМОЙ РС-1.....55**

*К.Р. Зейналова, Е.В. Степанова*

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РМЖ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ HER-2.....61**

*Н.И. Казачкина, А.А. Панкратов, Р.И. Якубовская, В.М. Негримовский*

**ИНДУКЦИЯ ПРОТОПОФИРИНА IX В ТКАНЯХ МЫШЕЙ ПРИ НАРУЖНОМ ПРИМЕНЕНИИ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОСТАВЕ ВОДНЫХ ГЕЛЕЙ.....67**

*Т.А. Маньчева, Н.А. Плотникова*

**МЕЛАТОНИН И МЕТФОРМИН ПОДАВЛЯЮТ ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ ПРИ ИНДУЦИРОВАННЫХ БЕНЗ(А)ПИРЕНОМ НЕОПЛАЗИЯХ У МЫШЕЙ.....73**

*А.Ж. Муктубаева, Н.А. Шаназаров, А.Х. Сабиров, М.В. Антонов*

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТИНА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА.....79**

*М.А. Сеньчукова, О.В. Мельников, Д.Ю. Воронов, Д.В. Глухов, С.О. Митряков*

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОВЕДЕНИЯ ДО ОПЕРАЦИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ.....81**

*А.Г. Барышев*

**ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА В СВЕТЕ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛИ.....85**

## Правила оформления статей для публикации

в «Российском Биотерапевтическом Журнале».....49; 50; 54; 59; 60

Информационное письмо № 1

III Всероссийская научная конференция с международным участием

«Наноонкология», САРАТОВ, 6–7 СЕНТЯБРЯ 2011 г.....66; 71; 72 78; 88

Памяти Самуила Петровича Ярмоненко.....89

Список сокращений.....91

К 60-летию В.Н. Чарушина.....93

УДК 616-006.04:577.217.35:547.979.733

*Ю.В. Дутикова<sup>1</sup>, В.А. Ольшевская<sup>2</sup>, А.А. Штиль<sup>1</sup>, Д.Н. Калужный<sup>3</sup>***НЕ ТОЛЬКО ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ:  
ПОРФИРИНЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ДНК-ЛИГАНДЫ**<sup>1</sup>РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва<sup>2</sup>Институт элементоорганической химии имени А.Н.Несмеянова РАН, Москва<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН, Москва**Контактная информация:***Дутикова Юлия Вячеславовна, аспирант лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(499)612-78-34**e-mail:** dutikova\_ronc@yahoo.com

Статья поступила: 18.04.2011, принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

Химические соединения, содержащие тетрапиррольные макроциклы – порфирины и их производные – известны как основа получения препаратов для фотодинамической терапии опухолей (фотосенсибилизаторов). Вместе с тем, широкие возможности химической модификации порфиринов, а также преимущественное накопление в опухолевых клетках позволяют предполагать, что в указанном химическом классе могут быть получены лекарственные соединения с самостоятельным противоопухолевым действием. Рассмотрены механизмы взаимодействия порфиринов и их производных с ДНК – внутриклеточной мишенью, важной для цитотоксичности химических соединений. Возможность ингибирования порфиринами функции ДНК-зависимого фермента теломеразы обуславливает перспективность развития химии тетрапиррольных соединений для получения новых мишень-направленных противоопухолевых препаратов.

**Ключевые слова:** ДНК, порфирины, злокачественные опухоли.*Yu.V. Dutikova<sup>1</sup>, V.A. Ol'shevskaya<sup>2</sup>, A.A. Shtil<sup>1</sup>, D.N. Kaluzhny<sup>3</sup>***BEYOND PHOTODYNAMIC THERAPY:  
PORPHYRINS AND THEIR DERIVATIVES AS ANTITUMOR DNA-LIGANDS**<sup>1</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow<sup>2</sup>A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of RAS, Moscow<sup>3</sup>V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of RAS, Moscow**Abstract**

The compounds containing the tetrapyrrolic macrocycle, that is, porphyrins and their derivatives, are known as scaffolds for anticancer photodynamic therapy agents (photosensitizers). However, porphyrins are exceptionally suitable for chemical modifications; moreover, these compounds can preferentially accumulate in tumor cells. Multiple structural modifications allow for the design of agents capable of evoking the cytotoxicity per se, i.e., the compounds that kill tumor cells being administered alone. We analyze the modes and quantitative parameters of binding of porphyrins and their derivatives to DNA, a major intracellular target important for the antitumor potency of chemotherapeutic drugs. In particular, a possibility to inhibit the DNA-dependent enzyme telomerase makes the tetrapyrrole-based compounds perspective as anticancer agents beyond their established role as photosensitizers.

**Key words:** DNA, porphyrins, tumors.**Введение**

Природные и синтетические соединения, содержащие тетрапиррольные макроциклы (порфирины, хлорины, бактериохлорины и их производные) широко используются для получения фотосенсибилизаторов – препаратов, терапевтический эффект которых обусловлен не непосредственным влиянием на патологический процесс, а активацией в ответ на действие дополнительного фактора – света (фотодинамическая терапия опухолей, дерматозов, инфицированных ран и др.). Одно из основных требований к таким соединениям – минимальная самостоятельная (темновая) цитотоксичность. Однако с позиций медицинской химии и фармацевтики порфирины перспективны и за пределами использования их как фотосенсибилизаторов.

Во-первых, структура порфиринов представляет широкие возможности для многообразных химических модификаций координационной сферы и периферии макроциклов.

Во-вторых, порфирины способны накапливаться преимущественно в опухолевых клетках. Эти важнейшие обстоятельства позволяют предполагать, что в указанном химическом классе могут быть получены лекарственные соединения с самостоятельным противоопухолевым действием. Для этого порфирины должны взаимодействовать с внутриклеточными мишенями, важными для индукции гибели опухолевых клеток. Такой мишенью является, в частности, геномная ДНК.

Мы рассматриваем механизмы взаимодействия порфиринов и их производных с различными структурами ДНК как основу развития химии порфиринов для получения лекарств с самостоятельной противоопухолевой активностью.

**ДНК****как внутриклеточная мишень порфиринов**

Существуют различные типы комплексов, образуемых низкомолекулярными соединениями с различными структурами ДНК.

Так, хлорамбуцил, митомин С и антрамицин образуют шивки комплементарных нитей ДНК; для актиномицина Д, антрациклиновых антибиотиков и производных индокарбазола характерно интеркаляционное взаимодействие с ДНК – расположение хромофорных фрагментов молекул лиганда между соседними парами оснований двойной спирали так, что плоскость лиганда перпендикулярна оси ДНК [10].

Порфирины образуют различные типы комплексов с ДНК в зависимости от собственного строения и первичной и вторичной структуры участка макромолекулы. Так, порфирины, не имеющие аксиальных лигандов, взаимодействуют с ДНК по механизму интеркаляции [1; 11]. Интеркаляционный тип взаимодействия характеризуется высокими значениями константы связывания ( $\sim 10^6 \cdot \text{M}^{-1}$ ), что предполагает высокую способность образовывать комплекс ДНК-лиганд. Металлсодержащим порфиринам гораздо сложнее образовывать интеркаляционные комплексы с ДНК, т.к. такой лиганд имеет больший объем по сравнению с безметалльным порфирином, что затрудняет его встраивание между смежными парами оснований. Для таких лигандов характерен внешний тип связывания: молекула хромофор фиксируется на поверхности спирали ДНК в узкой бороздке, а положительно заряженные периферические заместители электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК [3].

Производные пиридилпорфиринов представляются перспективными, т.к. могут образовывать устойчивые высокоаффинные комплексы с ДНК. Данные порфирины имеют плоскую или относительно плоскую структуру в зависимости от расположения атома азота в пиридинсодержащем заместителе. Наличие одного или нескольких положительных зарядов обеспечивает взаимодействие таких лигандов с ДНК. Количество пиридиловых заместителей позволяет регулировать заряд молекулы и её гидрофильность-липофильность – свойства, важные для доставки лиганда к опухоли и внутриклеточного распределения. М.А. Сарг и соавт. сравнили взаимодействие различных мезо-(4-пиридил)<sub>n</sub>(фенил)<sub>4-n</sub> порфиринов с двухцепочечной ДНК [15]. Исследованы порфирины, содержащие 2-4 пара-( $\text{CH}_3\text{P}$ ), мета-( $\text{CH}_3\text{M}$ ) и орто-аксиальных лиганда, т.к. монозамещенные производные оказались малорастворимыми в водных буферах. Из группы исследованных порфиринов серии  $\text{CH}_3\text{P}$  и  $\text{CH}_3\text{M}$  могут принимать плоскую конформацию и имеют подвижные пиридиловые кольца, а орто-соединения лишены подвижной структуры (рис. 1).

Методом спектрофотометрического титрования исследовано взаимодействие порфиринов с ДНК (табл. 1).

На основании полученных данных были выявлены зависимости между числом, расположением зарядов и величиной константы связывания. В ряду пара-, мета-, орто-пиридиловых порфиринов константа связывания уменьшается с приближением атома азота к макроциклу и снижением подвижности колец. Наибольшие значения константы связывания соответствуют пара-производным. Величина константы связывания характеризует полноту протекания реакции взаимодействия лиганда-ДНК и является одним из важных параметров при оценке практической перспективности лиганда. Также наблюдается линейное уменьшение значения константы связывания с уменьшением количества положительных зарядов, приходящихся на одну мо-

лекулу порфирина. Таким образом, пара- и метатетрапиридилпорфирины – наиболее перспективные соединения, образующие комплексы с двухцепочечной ДНК.

Сравнение порфиринов пара- и мета-серий с их медными и железными комплексами показало, что значения констант связывания медных комплексов превышало таковые для безметалльных порфиринов, а введение железа в макроцикл приводило к выраженному снижению константы связывания. Так, константа связывания 5,10,15,20-(4-метилпиридил)порфирина  $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ , константа его медного комплекса  $1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , а константа связывания железного комплекса составляет  $6,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Такое различие значений констант связывания объясняется различием пространственных структур молекул. Безметалльная молекула имеет планарную структуру с подвижными пиридиловыми кольцами; небольшой объем и «подвижность» молекулы облегчают ее встраивание между парами оснований ДНК [20].

R. Song и соавт. [16] исследовали взаимодействие с ДНК дизамещенных природных и синтетических производных пиридилпорфиринов. Основное влияние на величину константы связывания оказывает положение атома азота в пиридиловом заместителе (рис. 2). Сильнее с ДНК связываются пара-пиридилпорфирины. Незаряженные же заместители не оказывают существенного влияния на величину константы связывания. Авторы ограничились использованием заместителей, свободно вращающихся относительно макроцикла. Возможно, этим объясняется малое различие величины константы связывания [18].

Анализ спектров кругового дихроизма выявили первичную роль стерического эффекта в связывании с ДНК, в то время как влияние электронного эффекта минимально. Соединения **4**; **5** и их аналоги, содержащие помимо двух пиридиловых заместителей фенильные и этильные, имеют внешний тип связывания с ДНК.

Соединение **6**, не содержащее других заместителей, кроме пиридиловых, является высокоаффинным интеркалятором. Порфирин **11** связывается с ДНК внешним способом. Эти данные позволяют добавить к вышеизложенному то, что наличие незаряженных заместителей (особенно объемных) снижает величину константы связывания.

#### **Порфирины – перспективные ингибиторы теломеразы** **Взаимодействие** **с гуаниновыми квадруплексами ДНК**

Одним из значимых отличий нормальных клеток от опухолевых является их способность к неограниченной пролиферации. В 1985 г. Грейдер и Блекборн выяснили, что концы линейных хромосом (теломеры) одноклеточного организма *Tetrahymena* образованы короткой tandemно повторяющейся последовательностью ДНК, которую синтезирует РНК-зависимая ДНК-полимераза (теломераза) [4; 8; 13]. Теломеры – концевые участки хромосом, представляющие собой многократные повторы нуклеотидной последовательности TTAGGG. В нормальной клетке после каждого деления теломеры укорачиваются. При достижении критической длины теломер происходит остановка клеточного цикла. Сигналом к остановке размножения клеток является изменение структуры концевой участка теломеры, представляющего собой одонитевую ДНК, способную образовывать квадруплексную структуру (петлю) и защищающую теломеру от действия нуклеаз.

Укорочение длины этой однонитевой ДНК вследствие ее неполной репликации или повреждений при генотоксических стрессах (активные формы кислорода и др. мутагены) приводит к нарушению структуры квадруплексной петли что, как и многие другие нарушения структуры ДНК, является сигналом к остановке пролиферации.

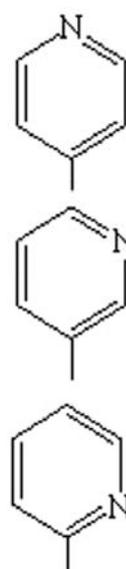
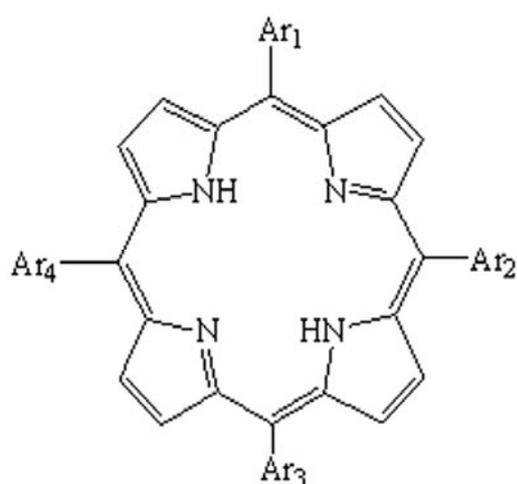
Теломераза достраивает теломерные повторы и однонитчатый концевой участок, поддерживая нормальную структуру петли.

В результате предотвращается остановка деления клеток.

Во многих типах нормальных клеток человека теломераза неактивна, тогда как в опухолевых клетках она, как правило, активирована. Например, при исследовании теломеразной активности в нейробластомах было выяснено, что из 100 образцов 6 не проявляли теломеразной активности, 73 обладали низкой активностью, 21 – высокой.

Доля опухолей, обладающих теломеразной активностью, зависит от типа клеток. Например, повышенной теломеразной активностью обладают около 10 % анапластических астроцитом, 75 % глиобластом и 100 % олигодендроглиом, 93 % форм рака молочной железы, 80 % опухолей легких.

При мелкоклеточном раке легкого почти в 100 % случаев обнаруживается высокая теломеразная активность. Корреляция теломеразной активности со злокачественностью показана также при опухолях желудка, толстой кишки, печени, предстательной железы, почек и кожи. Следовательно, ингибирование теломеразы – важный аспект противоопухолевой терапии. Если стабилизировать структуру теломерной ДНК низкомолекулярным лигандом, доступность теломеры для фермента снизится, достройка теломер ослабнет или прекратится, и опухолевая клетка не сможет делиться неограниченно. Таким образом, создание лекарств – ингибиторов теломеразы предусматривает стабилизацию квадруплексной структуры теломерной ДНК. Богатые гуанином последовательности способны образовывать квадруплексные структуры, геометрия и физические свойства которых зависят от ионных условий. В натрийсодержащем буфере тандемная последовательность на концах теломер образует антипараллельный квадруплекс (telQ), характеризующийся наличием 3 G-тет-раздров, диагональной TTA-петли с одной стороны и двух боковых TTA-петель с другой [5]. Замена натрия на калий, имеющий больший диаметр, приводит к изменению структуры ДНК в растворе [12; 14].



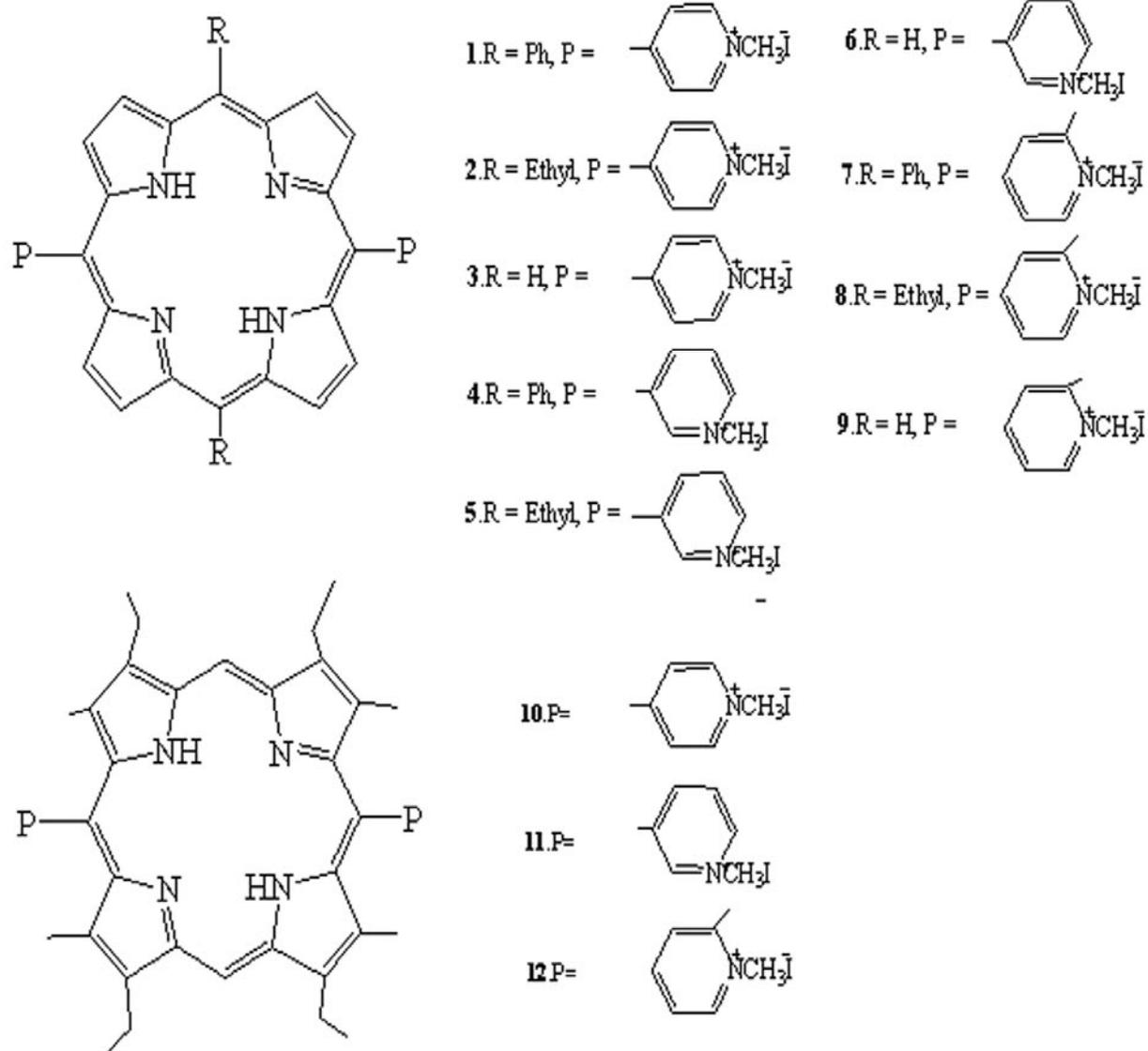
P4, P3, P2-cis, P2-trans, P1

M4, M3, M2-cis, M2-trans, M1

O4, O3, O2-cis, O2-trans, O1

Ar1=Ar2=Ar3=Ar4= X-N - pyridyl  
 Ar1=Ph; Ar2=Ar3=Ar4= X-N - pyridyl  
 Ar1=Ar2=Ph; Ar3=Ar4= X-N - pyridyl  
 Ar1=Ar3=Ph; Ar2=Ar4= X-N - pyridyl  
 Ar1=Ar2=Ar3=Ph; Ar4= X-N - pyridyl

Рис. 1. Производные мезо-(N-метил-4(или 3 или 2)-пиридил)<sub>n</sub>(фенил)<sub>4-n</sub>порфирина.



**Рис. 2.** Структура дикаationных пиридиловых порфиринов.

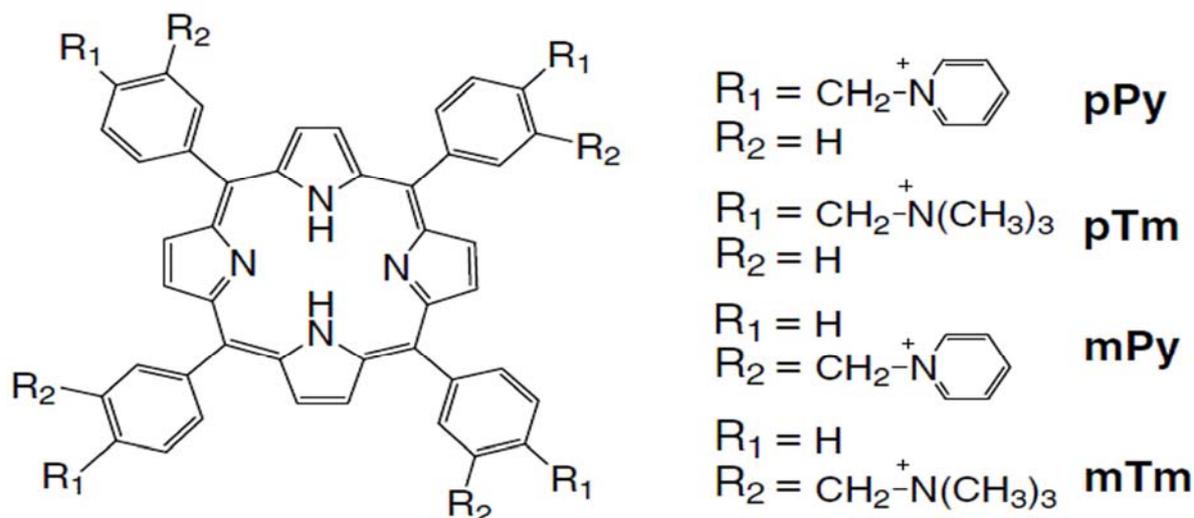


Рис. 3. Квадруплекс-стабилизирующие порфириновые лиганды.

Таблица 1

Константы связывания порфирин-ДНК

Порфирин	Константа связывания · 10 <sup>-4</sup> М <sup>-1</sup>
5,10,15,20-(4-метилпиридил)порфирин	1000±200
5,10,15-(4-метилпиридил)-20-фенилпорфирин	300±80
5,10-(4-метилпиридил)-15,20-дифенилпорфирин	120±30
5,15-(4-метилпиридил)-10,20-дифенилпорфирин	140±40
5,10,15,20-(3-метилпиридил)порфирин	160±30
5,10,15-(3-метилпиридил)-20-фенилпорфирин	50±10
5,10-(3-метилпиридил)-15,20-дифенилпорфирин	18±3
5,15-(3-метилпиридил)-10,20-дифенилпорфирин	16±4
5,10,15,20-(2-метилпиридил)порфирин	40±6
5,10,15-(2-метилпиридил)-20-фенилпорфирин	16±2
5,10-(2-метилпиридил)-15,20-дифенилпорфирин	9±2
5,15-(2-метилпиридил)-10,20-дифенилпорфирин	5±1

Таблица 2

Ингибирование теломеразы

Порфирин	Металл	% ингибирования при 25 мкМ
TMPyP4	H <sub>2</sub>	88
TMPyP4	Zn(II)	88
TMPyP4	Co(II)	83
TMPyP4	Fe(III)	63
TMPyP4	Ni(II)	42
TMPyP4	Mn(III)	37
TMPyP4	Cu(II)	75
TMPyP4	Mg(II)	42
TMPyP4	Pt(II)	69
TMPyP4	Pd(II)	41
TMPyP4	TiO	28
TMPyP4	VO	2
TMPyP4	Sn	19
TMPyP4	In(III)	47
TMPyP4	Al(III)	56
TMPyP4	Au(III)	23
TMPyP4	Ga(III)	27
TMPyP4	Er(III)	2
TMPyP4	Eu(III)	12
TMPyP4	Gd(III)	24
TMPyP4	Yb(III)	40
TMPyP4	Lu(III)	27
TMPyP4	Pr(III)	23
TMPyP4	Tb(III)	17
QP3	H <sub>2</sub>	56

Таблица 3

Темновая токсичность порфиринов (мкМ)

Линия клеток	Порфирин						
	TMePyP4			QP3			
		(Pt)	(Cu)	(In)		(Cu)	(In)
<b>Опухоли молочной железы</b>							
MCF-7	49,6	100	47,8	100	212	100	134,2
MDA-231	44	100	220,5	390,1	597	226	116,5
BT-20	106,4	261,7	9,8	160,8	81,4	20,4	79,1
<b>Опухоли предстательной железы</b>							
PC3	184	200	384,7	200	304,7	100	111,5
DU145	93,6	1356,6	90,7	1166,6	323,3	40,9	27,1
LNCap	22,8	42,2	126,4	62,2	–	–	–
<b>Лимфомы</b>							
Daudi	3,1	103,5	–	5,3	34	–	–
Raji	11,9	64,6	69,7	43,7	–	–	–
<b>Неопухолевые фибробласты</b>							
NHLF	13,5	11,6	228,1	100	191,2	4,9	86,2

Основными критериями принадлежности химического соединения к квадруплексным лигандам являются физико-химические параметры, обеспечивающие значение константы связывания  $K_{TelQ} \geq 10^6 M^{-1}$ , селективность взаимодействия лиганда с квадруплексом по отношению к дуплексу ( $K_{G4} / K_{dsDNA} \geq 100$ ).

К биологическим параметрам относятся специфичная по отношению к опухоли цитотоксичность, вызывание старения опухолевых клеток, ингибирование активности теломеразы, ингибирование связывания ДНК с hPOT1, регулирующим длину хромосом, освобождение теломеры от hTERT – теломеразы человека, достраивающей концы хромосом.

Способность образовывать устойчивые комплексы с молекулами ДНК и накапливаться в опухолевых клетках определяет значение порфиринов, несущих положительно заряженные заместители, как перспективных соединений, способных взаимодействовать со сложными квадруплексными структурами и подавлять теломеразную активность.

Одним из наиболее изученных лигандов для TelQ является 5,10,15,20-тетра-(N-метил-4-пиридил)порфирин (TMePyP4). Известно несколько типов его взаимодействия с квадруплексной структурой. Было установлено [7; 19], что размер порфиринового кольца соответствует размеру гуанинового тетраэдра квадруплекса, что обеспечивает их взаимодействие за счет перекрывания  $\pi$ -орбиталей. Это позволяет молекулам порфирина встраиваться в широкую бороздку квадруплекса и между соседними G-квартетами.

Zh. NiiJuan и соавт. [9] исследовали взаимодействие TMePyP4 с telQ в присутствии ионов калия. Размер иона калия превышает размер иона натрия. Установлено, что калий образует очень устойчивый комплекс с квадруплексной структурой [6] и препятствует встраиванию макроцикла между квартетами.

Немаловажной характеристикой является и способность лиганда термически стабилизировать квадруплексную структуру, повышая температуру плавления квадруплекса, так как теломераза способна достраивать теломеру только в развернутом состоянии. T. Yamashita и соавт. [19] исследовали влияние ряда катионсодержащих порфиринов на термостабильность квадруплексной структуры. В качестве препарата сравнения выбрано соединение TMePyP4, повышающее температуру плавления квадруплексной

структуры на 4,8 °С. Повышение температуры плавления составляет соответственно рТm, 5,2 °С; рРу, 6,1 °С; mТm, 11,4 °С и mРу, 17,2 °С (рис. 3).

Наиболее высокие значения температуры плавления комплекса лиганд-ДНК соответствуют мета-замещенным порфиринам.

В то же время найдено, что величина  $\Delta T$  плавления для пиридилсодержащих порфиринов выше, чем для их триметиламмонийсодержащих аналогов.

Авторы сделали вывод, что расположение мета-изомеров относительно порфириновой плоскости наиболее благоприятно для стабилизации сахаро-фосфатного остова квадруплекса и его бороздок. Меньший объем ароматического кольца по отношению к триметиламмонию также способствует лучшему взаимодействию пиридилсодержащего лиганда с квадруплексной структурой.

#### **Темновая токсичность ДНК-связывающих порфиринов**

На основании физико-химических методов исследования порфирины представляются перспективными противоопухолевыми препаратами.

Однако окончательный вывод о возможности их применения можно сделать исходя из биологических исследований. Критериями оценки являются способность порфиринов локализоваться в ядре клетки (достигать мишени); оказывать ингибирующее действие на теломеразу; вызывать гибель опухолевых клеток.

Наиболее изученными в этой области также являются производные TMePyP4 [16]. Исследовали внутриклеточное распределение TMePyP4 на линии MCF-7 – рак молочной железы [2; 17].

Ядерная локализация значительно превосходила локализацию порфирина в цитоплазме (1,4–78 мм)/(00,47–434 мкм). Исследовали ряд порфиринов, имеющих высокие константы связывания ( $10^6 M^{-1}$  и выше) с дуплексной и квадруплексной структурами ДНК [17].

Было изучено ингибирующее действие TMePyP4, 5,10,15,20-тетра(N-метил-3-хинолил)порфирина (QP3) и их металлокомплексов на активность теломеразы в бесклеточной системе (табл. 2). Также изучали токсическое действие данных порфиринов для ряда клеточных линий (табл. 3).

Изученные порфирины обладали способностью ингибировать теломеразу в микромолярных концентрациях.

Вернемся к взаимосвязи пространственной структуры и ингибирующего действия.

Мы видим, что наиболее сильными ингибиторами являются соединения, обладающие планарной структурой (цинковое, кобальтовое, медное, палладиевое, платиновое производные).

Комплексы, имеющие октаэдрическую (железный, марганцевый) или пирамидальную структуру (индий, алюминий, оксиды титана и ванадия) гораздо менее эффективны.

То же можно сказать о способности порфирина связываться с ДНК (планарные структуры

легче встраиваются в бороздки ДНК и между тетрадрами квадруплекса).

### Выводы

Таким образом, порфирины, обладающие высокой аффинностью к ДНК, способны ингибировать теломеразу и следовательно, индуцировать гибель опухолевых клеток, находясь в низких концентрациях. Это делает порфирины перспективными противоопухолевыми агентами, что покажет дальнейшее исследование.

### Литература

1. Колесникова Д.В., Жузе А.Л., Заседателев А.С. ДНК-специфичные низкомолекулярные соединения. – М.: МФТИ, 1998. – 20 с.
2. Ahmet G., Silver H. Measurement of the Rate of Subcellular Localization of Porphyrins in Cells Using Fluorescence Digital Imaging Microscopy // Photochem. Photobiol. – 1994. – 59. – P. 419–22.
3. Andrews K., McMillin D.R. A pared-down version of 5,10,15,20-tetra(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin intercalates into B-form DNA regardless of base composition: Binding studies of tri(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrins // Biochemistry. – 2008. – 47. – P. 1117–25.
4. Donate L.E., Blasco M.A. Telomeres in cancer and aging // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2011. – 366 (1561). – P. 76–84.
5. Gellert M., Lipsett M.N., Davies D.R. Helix formation by guanylic acid // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1962. – 48. – P. 2013–8.
6. Gu J., Leszczynski J. Origin of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> selectivity of the guanine tetraplexes in water: The theoretical rationale // J. Phys. Chem. A. – 2001. – 106. – P. 529–32.
7. Han F.X., Wheelhouse R.T., Hurley L.H. Selective interactions of cationic porphyrins with G-quadruplex structures // J. Am. Chem. Soc. – 2001. – 123. – P. 8902–13.
8. Heaphy C.M., Meeker A.K. The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis // J Cell Mol Med. – 2011. – 25. – P. 122–37.
9. HuiJuan Zh., XueFei W., Peng W. et al. Interactions between meso-tetrakis(4-(N-methylpyridiumyl)) porphyrin TMPyP4 and DNA G-quadruplex of telomeric repeated sequence TTAGGG // Sci China Ser B-Chem. – 2008. – 51(5). – P. 452–6.
10. Hurley L.H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy // Nat Rev Cancer. – 2002. – 2. – P. 188–200.
11. Hyun K.-M., Choi S.-D., Lee S., Kim S. K. Can energy transfer be an indicator for DNA intercalation? // Biochimica et Biophysica Acta. – 1997. – 1334. – P. 312–6.
12. Pagano B., Mattia C.A., Giancola C. Applications of Isothermal Titration Calorimetry in Biophysical Studies of G-quadruplexes // Int. J. Mol. Sci. – 2009. – 10. – P. 2935–57.
13. Park M., Bruce T.C. Development of potential anticancer agents that target the telomere sequence // Bioorg Med Chem Lett. – 2010. – 20(13). – P. 3982–6.
14. Pilch D.S., Plum G.E., Breslauer K.J. The thermodynamics of DNA structures that contain lesions or guanine tetrads // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1995. – 5. – P. 334–42.
15. Sari M.A., Battioni J.P., Dupré D. et al. Interaction of cationic porphyrins with DNA: importance of the number and position of the charges and minimum structural requirements for intercalation // Biochemistry. – 1990. – 29(17). – P. 4205–15.
16. Song R., Kim Y.-S., Leed C.O., Sohn Y.S. Synthesis and antitumor activity of DNA binding cationic porphyrin–platinum(II) complexes // Tetrahedron Letters. – 2008. – 44. – P. 1537–40.
17. Zhao P., Xu L.-C., Huang J.-W., Liu J., Yu H.-C., Zheng K.-C., Ji L.-N. Experimental and DFT studies on DNA binding and photocleavage of two cationic porphyrins Effects of the introduction of a carboxyphenyl into pyridinium porphyrin // Spectrochimica Acta Part A 71 – 2008. – P. 1216–1223.
18. Wheelhouse R.T., Hurley L.H. Porphyrin compounds as telomerase inhibitors. US006087493A. 5.02.1997.
19. Wu S., Li Zh., Ren. L. et al. Dicationic pyridium porphyrins appending different peripheral substituents: synthesis and studies for their interactions with DNA // Bioorganic&Medical Chemistry. – 2006. – 14. – P. 2956–65.
20. Yamashita T., Uno T., Ishikawa Yo. Stabilization of guanine quadruplex DNA by the binding of porphyrins with cationic side arms // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2005. – 13. – P. 2423–30.

<i>Е.В. Степанова, К.Р. Зейналова</i> <b>МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТРАСТУЗУМАБУ</b> .....	3
<i>З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова, Е.Г. Славина</i> <b>НКТ-КЛЕТКИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ</b> .....	9
<i>Д.Ю. Блохин, Е.Ф. Чмутин, П.К. Иванов</i> <b>МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ: ФАКТОРЫ РОСТА, АНГИОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА</b> .....	17
<i>И.Н. Григорьева, Т.К. Харатицивили, А.Ю. Барышников</i> <b>ВАСКУЛОГЕННАЯ МИМИКРИЯ – АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ ОПУХОЛИ?</b> .....	25
<i>Г.В. Какурина, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов</i> <b>ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОГНОЗЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ</b> .....	31
<i>П.М. Бычковский, А.А. Кладиев, С.О. Соломевич, С.Ю. Щеголев</i> <b>ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ</b> .....	37
<b>ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ</b>	
<i>М.В. Антонов, А.Х. Сабиров, Т.М. Сабиров, К.В. Уткин, В.В. Решетникова, А.Ю. Барышников, О.Д. Мустаев</i> <b>ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ТАРГЕТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ</b> .....	47
<i>А.В. Самойлов, В.В. Мартиросян, А.Ю. Барышников, Н.М. Сураева</i> <b>ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЕТУХА В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ</b> .....	53
<i>В.М. Бухман, И.Б. Меркулова, Н.П. Ермакова, О.И. Коняева, Е.Л. Членова, Н.Ю. Кульбачевская, Т.В. Абрамова, А.А. Сергеев, Ю.Е. Чикунова, А.Л. Николаев, Л.М. Михайлова</i> <b>ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА КРЫСАХ ЛОКАЛЬНОГО УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СРЕДНЕЙ ИНТЕНСИВНОСТИ, ГЕНЕРИРУЕМОГО УСТАНОВКОЙ «УСДГ»</b> .....	57
<i>И.В. Манина, Н.М. Сапрыкина, А.М. Козлов, И.Н. Михайлова, И.Н. Григорьева, Н.Н. Касаткина, А.Ю. Барышников</i> <b>ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНОЙ GM-CSF СЕКРЕТИРУЮЩЕЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ ПУТЕМ ПРЕИНКУБАЦИИ С ЦИТОКИНАМИ</b> .....	61
<i>А.В. Безгин, Л.А. Князева</i> <b>ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И КЛИНИЧЕСКУЮ СИМПТОМАТИКУ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЗИТИВНОСТИ ПО РЕВМАТОИДНОМУ ФАКТОРУ</b> .....	67
<i>И.О. Чикилева, М.В. Киселевский, Т.В. Борисова, О.Г. Фотиади, А.В. Караулов</i> <b>ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ</b> .....	71
<i>Т.В. Осипова, Т.П. Рябых, З.А. Соколова, В.И. Карасева, Н.Б. Паклин</i> <b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ В ФОРМАТЕ БИОЧИПА: РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ</b> .....	77
<i>В.А. Галькин, Н.В. Кожмякина, Е.П. Ананьева, С.В. Гурина</i> <b>ДЕЙСТВИЕ УГЛЕВОДНЫХ ФРАКЦИЙ МИЦЕЛИЯ FOMES FOMENTARIUS И GANODERMA APPLANATUM НА РОСТ ПОДКОЖНО ПЕРЕВИТОЙ ОПУХОЛИ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ</b> .....	83
<i>Е.Д. Хадиева, И.Р. Лукманов, А.Х. Сабиров, К.О. Шилин, В.П. Зуевский, В.Л. Янин, В.Г. Бычков</i> <b>МОДЕЛИРОВАНИЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖКТ У СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ НА ФОНЕ СУПЕРИНВАЗИОННОГО ОПИСТОРХОЗА</b> .....	87
<i>Е.В. Степанова, И.А. Файнштейн</i> <b>ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ</b> .....	91
<i>О.В. Короткова, Т.Н. Заботина, Л.В. Скотаренко, А.А. Борунова, Н.Ю. Очеева, И.К. Воронников, З.Г. Кадагидзе</i> <b>СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РМЖ</b> .....	95
<i>Д.В. Соколова, Е.В. Тазина, М.А. Кортава, П.К. Иванов, Е.В. Игнатьева, А.П. Полозкова, Е.М. Трещалина, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников</i> <b>АНТИ-МУС-1 ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДОКСОРУБИЦИНА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛЬ</b> .....	99
<i>В.Н. Капинус, М.А. Каплан, И.С. Спиченкова, Е.В. Ярославцева-Исаева, А.М. Шубина</i> <b>ФЛГ БАЗАЛЬНО-КЛЕТОЧНОГО И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ ГУБЫ</b> .....	105
<i>Беришвили А.И., Тупицын Н.Н., Лактионов К.П., Левкина Н.В., Кочоян Т.М., Керимов Р.А.</i> <b>ОСОБЕННОСТИ МИКРОМЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМЫ РМЖ В КОСТНЫЙ МОЗГ</b> .....	109
Список сокращений.....	113
Правила подачи статей.....	115

УДК 615.831:577.352.2

*З.С. Смирнова<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, Л.М. Борисова<sup>1</sup>, М.П. Киселева<sup>1</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1</sup>, О.Л. Орлова<sup>1</sup>,  
А.П. Полозкова<sup>1</sup>, Г.А. Меерович<sup>2</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>3</sup>*

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ  
С ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМОЙ ТИОСЕНСА  
НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ**

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

<sup>2</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

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

**Контактная информация:**

Санарова Екатерина Викторовна, лаборант-исследователь лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДyТО

адрес: 115478, Каширское ш., 24; тел. +7(495)324-0200

e-mail: sanarova8686@mail.ru

Статья поступила: 22.09.2011, принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

Изучена противоопухолевая активность ФДТ с использованием ЛЛЛФ фотосенсибилизатора Тиосенса – ближнего инфракрасного диапазона на пяти перевиваемых опухолях мышей. Наиболее чувствительными опухолями к ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса являются: опухоль Эрлиха, солидный вариант лимфоцитарной лейкемии Р-388 и саркома 37, на которой высокое торможение роста опухоли сочетается с излечением 33,3 % животных.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, ЛЛЛФ фотосенсибилизатора Тиосенса, противоопухолевая активность.

*Z.S. Smirnova<sup>1</sup>, E.V. Sanarova<sup>1</sup>, L.M. Borisova<sup>1</sup>, M.P. Kiseleva<sup>1</sup>, N.A. Oborotova<sup>1</sup>, O.L. Orlova<sup>1</sup>,  
A.P. Polozkova<sup>1</sup>, G.A. Meerovich<sup>2</sup>, E.A. Lukyanetz<sup>3</sup>*

**ANTITUMOR ACTIVITY OF PHOTODYNAMIC THERAPY  
WITH LIPOSOMAL FORMULATION OF TIOSENS  
ON THE TRANSPLANTABLE TUMORS OF MICE**

<sup>1</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

<sup>2</sup>A.M. Prokhorov General Physics Institute of Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>3</sup>State Research Center «NIOPIK», Moscow

**Abstract**

Studied antitumor activity of PDT with the use of FLDF of photosensitizer Tiosens – near-infrared range on the 5 transplantable tumors of mice. The most sensitive tumors to PDT with FLDF of Tiosens are: tumor Ehrlich, a solid form leukemia P-388 and sarcoma 37, on which high inhibition of the tumor growth is combined with the recovery of 33,3 % of the animals.

**Key words:** photodynamic therapy, FLDF of photosensitizer Tiosens, antitumor activity.

**Введение**

Фотодинамическая терапия – метод лечения злокачественных опухолей, основанный на способности фотосенсибилизаторов селективно накапливаться в ткани опухоли и при локальном воздействии лазерного облучения определенной длины волны генерировать образование синглетного кислорода и активных радикалов, оказывающих повреждающее действие на опухолевые клетки [8; 10; 13]. Эффективность фотодинамического повреждения сенсibilизированной клетки определяется внутриклеточной концентрацией сенсibilизатора, его локализацией в клетке и фотохимической активностью (квантовым выходом генерации синглетного кислорода или свободных радикалов), дозой лазерного облучения. Кроме прямого цитотоксического воздействия на опухолевые клетки при ФДТ важную роль в противоопухолевом действии играют: нарушение кровоснабжения за счет повреждения и/или тромбоза кровеносных сосудов опухолевой ткани; цитокиновые реакции, связанные с повышенной продукцией фактора некроза опухоли, активацией макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов.

Одним из недостатков метода ФДТ с большинством ФС, созданных до настоящего времени, является кожная фототоксичность, связанная с длительным сохранением высокой концентрации ФС в коже, что требует соблюдения пациентом «темнового» режима в течение определенного времени. Этот недостаток дает основание для создания ФС, обладающих такими свойствами, как низкая темновая и световая токсичность, высокая селективность накопления в тканях новообразований, быстрое выведение из организма, высокий квантовый выход триплетного состояния с энергией не менее 94 кДж/моль для эффективного образования синглетного кислорода, интенсивный максимум поглощения света в области 700–900 нм, что обеспечивает более глубокое проникновение света и повреждение опухоли [2; 9]. Одним из ФС второго поколения, обладающих большинством из перечисленных свойств, является Тиосенс – тетра-3-фенилтиофталочинин алюминия гидроксида, синтезированный в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» [6]. Как большинство фталочининовых ФС Тиосенс накапливается в основном в митохондриях [9; 14] опухолевых клеток и при облучении лазером с определенной длиной волны (717±4 нм) вызывает их повреждение.

Область поглощения света Тиосенсом позволяет говорить о большей глубине проникновения лазерного излучения в ткань опухоли по сравнению с другими фталоцианиновыми ФС, что делает его перспективным препаратом для ФДТ [7; 11]. Но применение данного препарата ограничено наличием гидрофобных свойств, которые не позволяют вводить его внутривенно.

Преодолеть это препятствие позволяет применение специальных систем доставки [12]. В качестве таких систем используют липосомы, которые не только позволяют преодолеть нерастворимость препарата в воде, но также способствуют сохранению его в мономерном фотодинамически активном состоянии, что увеличивает селективность накопления препарата в опухоли и снижает кожную чувствительность.

### Материалы и методы

Работа выполнена на мышах-гибридах первого поколения BDF<sub>1</sub> (C<sub>57</sub> Bl/6 × DBA/2), F<sub>1</sub> (C<sub>57</sub> Bl/6 × CBA) и беспородных мышах, самках и самцах, массой 20–25 г. Мышей получали из отдела лабораторных животных РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН и содержали на обычном рационе питания.

Тиосенс, представляющий собой тетра-3-фенилтифталоцианина гидроксиалюминия, не растворимый в воде, синтезирован во ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», ЛЛЛФ Тиосенса разработана в лаборатории разработки лекарственных форм РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Исследования эффективности ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса проводили на опухоли Эрлиха, солидном варианте лимфоцитарной лейкемии Р-388, эпидермоидной карциноме легкого Льюис, аденокарциноме молочной железы Са-755 и саркоме 37 [5]. Опухоль Эрлиха перевивали мышам-гибридам F<sub>1</sub>, Р-388 – мышам-гибридам BDF<sub>1</sub>, саркому 37 – беспородным мышам внутримышечно в область голени асцитной жидкостью по 0,1 мл, содержащей 10<sup>6</sup> опухолевых клеток. LLC и Са-755 перевивали мышам-гибридам BDF<sub>1</sub> внутримышечно в область голени по 0,2 мл, измельченной до гомогенной консистенции и разбавленной средой 199 до соотношения 1:10 опухолевой ткани.

На 4–6 день после перевивки, когда объем опухолевого узла составлял 700–900 мм<sup>3</sup>, флакон ЛЛЛФ Тиосенса разводили 5,8 мл воды для инъекций и вводили мышам однократно внутривенно в дозе 6 мг/кг.

Через 5 ч проводили облучение опухоли лазером «ЛФД-730-01-БИОСПЕК» с длиной волны 720 нм и режимом облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> в течение 20 мин.

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

$$ТРО(\%) = \frac{V_k - V_{00}}{V_k} \times 100, \text{ где}$$

V<sub>k</sub> – средний объем опухолей в контрольной группе (мм<sup>3</sup>);  
V<sub>0</sub> – средний объем опухолей в опытной группе (мм<sup>3</sup>).

Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) вычисляется по формуле:

$$УПЖ\% = \frac{(СПЖ_0 - СПЖ_k)}{СПЖ_k} \times 100, \text{ где}$$

СПЖ<sub>k</sub> – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни);

СПЖ<sub>0</sub> – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Минимальные критерии активности – торможение роста опухоли ≥50 %, увеличение продолжительности жизни ≥25 %.

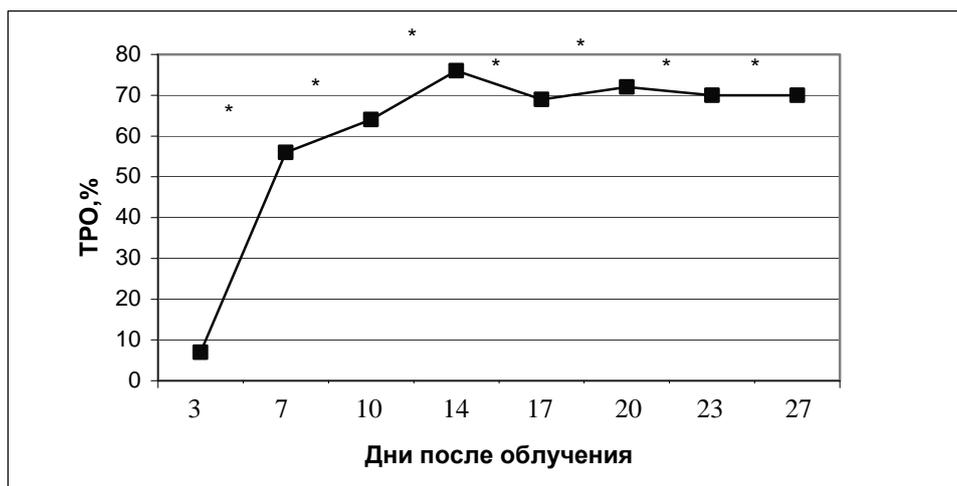
Учитывая, что лечение мышей начинали через 5 ч после введения ЛЛЛФ Тиосенса и проводили в течение 20 минут, опытные группы формировали из 6 мышей, а контрольную группу – из 8–10 животных. Опыт повторялся трижды, а результаты эффективности представлены средние.

Статистическая значимость противоопухолевого эффекта ЛЛЛФ Тиосенса по отношению к контролю определялась по методу Фишера – Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при p ≤ 0,05.

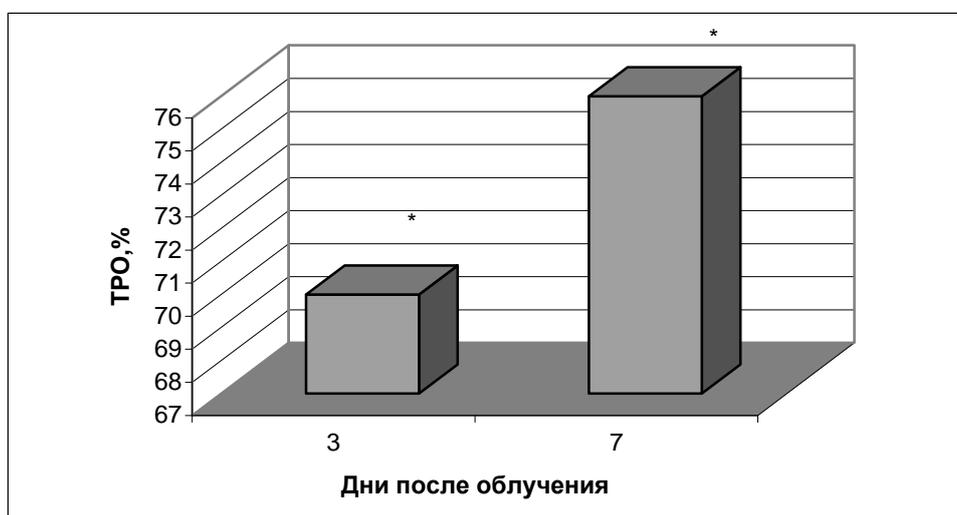
Получение липосомальных препаратов представляет собой сложный технологический процесс. На первом этапе получали однородную полупрозрачную липидную пленку путем растворения всех компонентов лекарственной формы: субстанции Тиосенса, яичного лецитина, холестерина и ПЭГ-2000-фосфатидилэтаноламина в хлороформе в круглодонной колбе с последующим отгоном растворителя при температуре фазового перехода липидов (+37 °С) на роторном испарителе ВУСН Rotavapor R-200 [4]. Далее образовавшуюся пленку сушили под вакуумом 30–50 мин и гидратировали деионизированной водой. Проводили предфильтрацию полученной дисперсии мультимеллярных везикул через фильтр с размером пор 1,2 мкм (размер липосом составил 605±10 нм). После этого измельчали на микрофлюидайзере в течение 8 мин (объем загрузки 300 мл). К полученной дисперсии приливали водный раствор криопротектора (сахароза), а для удаления не включившегося препарата и стерилизации проводили фильтрацию последовательно через фильтры с размером пор 0,45 и 0,22 мкм (размер липосом составил 120 ± 20 нм). На всех стадиях проводили измерение размера везикул на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer. Количественное содержание Тиосенса в ЛЛЛФ определяли спектрофотометрически с использованием РСО при длине волны 717±4 нм. Для стабилизации водной липосомальной дисперсии проводили лиофильную сушку на установке Edwards Minifast.

### Результаты и обсуждение

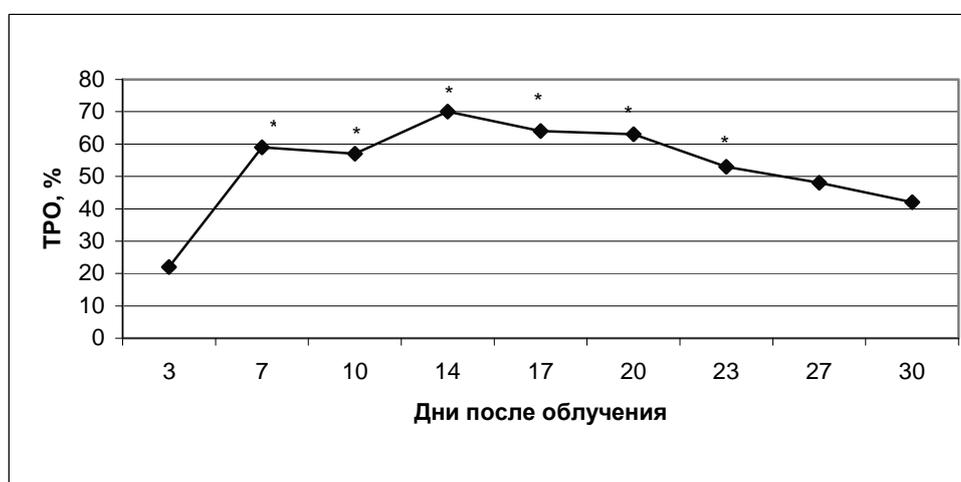
Данные представленные на рис. 1 показывают, что ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса проявляет достаточно высокий противоопухолевый эффект на опухоли Эрлиха. Статистически значимый противоопухолевый эффект, равный 56 % ТРО, выявляется уже на 7 день после лазерного облучения и длится до 27 дня (ТРО=70 %). Максимальный терапевтический эффект наблюдается на 14 день после лазерного облучения и составляет 76% ТРО. Эти данные свидетельствуют о длительном, в течение 20 дней, терапевтическом эффекте ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса на опухоли Эрлиха. Однако следует отметить, что статистически значимого увеличения продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными животными ни в одном опыте не наблюдается.



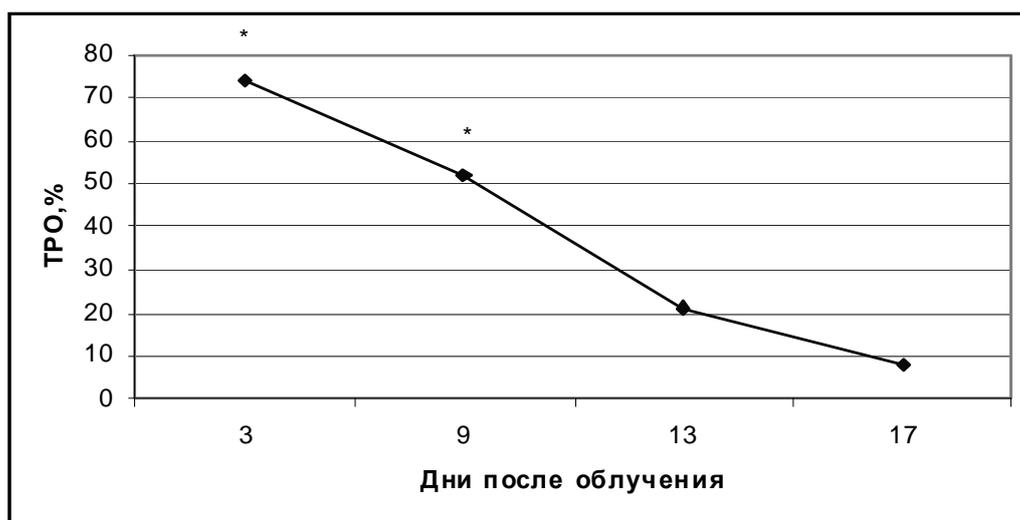
**Рис. 1.** Терапевтическая эффективность ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса в дозе 6 мг/кг при предварительном введении за 5 ч до лазерного облучения при плотности мощности 400 мВт/см<sup>2</sup> в течение 20 мин на опухоли Эрлиха. (\* $p < 0,05$  по отношению к контролю).



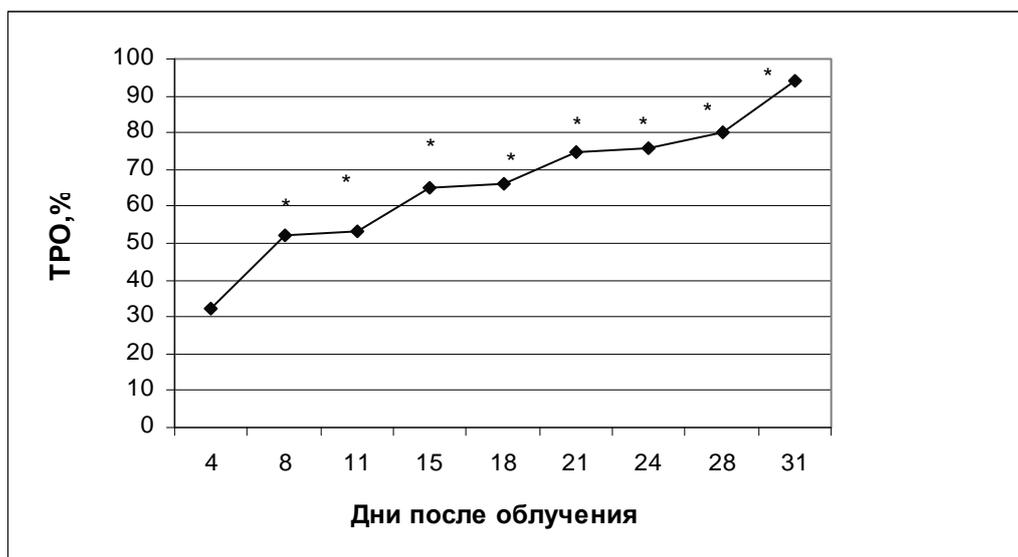
**Рис. 2.** Динамика торможения роста лимфоцитарной лейкемии Р-388 после ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса, введенной в дозе 6 мг/кг внутривенно за 5 ч до проведения лазерного облучения на 4 день опыта с параметрами облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> в течение 20 мин. (\* $p < 0,05$  по отношению к контролю).



**Рис. 3.** Динамика торможения роста LLC после ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса, введенной в дозе 6 мг/кг внутривенно за 5 ч до проведения лазерного облучения на 6 день опыта с параметрами облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> в течение 20 мин. (\* $p < 0,05$  по отношению к контролю).



**Рис. 4.** Динамика торможения роста Ca-755 после ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса, введенной в дозе 6 мг/кг внутривенно за 5 ч до проведения лазерного облучения на 6 день опыта с параметрами облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> в течение 20 мин. (\* $p < 0,05$  по отношению к контролю).



**Рис. 5.** Динамика торможения роста саркомы 37 после ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса, введенной в дозе 6 мг/кг внутривенно за 5 ч до проведения лазерного облучения на 6 день опыта с параметрами облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> в течение 20 мин. (\* $p < 0,05$  по отношению к контролю).

При сближном варианте лимфоцитарной лейкемии Р-388 терапевтический эффект ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса проявляется уже на 3 день после лазерного облучения и составляет 70 % ТРО, а к 7 дню противоопухолевый эффект возрастает до 76 % ТРО (рис. 2). Быстрая генерализация опухолевого процесса у мышей с лимфоцитарной лейкемией Р-388 не позволяет нам выявить максимальный эффект по критерию торможения роста опухоли. Статистически значимого УПЖ на этой модели опухолевого роста также не наблюдается.

ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса вызывает умеренный, но длительный противоопухолевый эффект у мышей с LLC (рис. 3).

Так на 7 день после лазерного облучения ТРО составляет 59 %, а на 23 день – 53 %. Максимальный терапевтический эффект наблюдается на 14 день после лазерного облучения и составляет 70 % ТРО.

ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса на Ca-755 оказывает умеренный и кратковременный терапевтический эффект (рис. 4). Через 3 дня после проведения ФДТ противоопухолевый эффект составляет 74 %, который затем постепенно начинает снижаться, и статистически значимый терапевтический эффект равный 52 % ТРО наблюдается на 7 день после лазерного облучения. При изучении эффективности ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса на саркоме 37 показано, что, начиная с 4 дня после лазерного облучения, ТРО начинает постепенно расти с 32 % (рис. 5). На 8 день после ФДТ торможение роста саркомы 37 достигает статистически достоверных значений – 52 %, а максимальное ТРО наблюдается на 31 день и составляет 94 %. В связи с гибелью контрольных мышей далее проследить за динамикой торможения роста опухоли было не возможно. Однако в процессе наблюдения за мышами с саркомой 37 в опытной группе 2 из 6 мышей были излечены (33,3 %).

Ранее полученные результаты исследования уровня и селективности накопления липосомальной лекарственной формы Тиосенса определяются в основном размерами липосом [1]. Оптимальный размер составляет около  $100 \pm 10$  нм. Более крупные липосомы менее эффективно проникают через дефекты сосудов опухолей. Эти данные дают основание предполагать, что разная эффективность ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса на перевиваемых опухолях мышей зависит от количества функциональных микрососудов в опухоли.

### Заключение

В результате проведенных исследований показано, что ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса проявляет противоопухолевую активность при всех изученных перевиваемых опухолях мышей. Однако следует отметить, что наиболее чувствительными опухолями к ФДТ с ЛЛЛФ Тиосенса являются: опухоль Эрлиха, сближенный вариант лимфоцитарной лейкемии Р-388 и саркома 37, на которой высокое торможение роста опухоли сочетается с излечением 33,3 % животных.

### Литература

1. Гуревич Д.Г., Меерович И.Г., Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления Тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 45–9.
2. Кубасова И.Ю., Вакуловская Е.Г., Ермакова К.В., Смирнова З.С. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия при лечении злокачественных опухолей головного мозга // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 54–63.
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. Санарова Е.В., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Лиофилизированная наноструктурированная лекарственная форма тиосенса // Всероссийский журнал научных публикаций. – 2011. – №8. – С. 74–6.
5. 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. – С. 71–107.
6. Ярцева И.В., Гатинская Л.Г., Дмитричева Н.А. и др. Количественное определение Тиосенса // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 33–4.
7. Allen C.M., Sharman W.M., Vanlier J.E. Current Status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer // J Porphyrins Phthalocyan. – 2001. – 5. – P. 161–9.
8. Allison R.R. Future FDT // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2009. – 6. – P. 231–4.
9. Allison R.R., Sibata C.H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2010. – 7. – P. 61–75.
10. Hopper C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer // Lancet Oncol. – 2000. – 1. – P. 212–9.
11. Miller J.P., Baron E.D., Scull H. et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical – translation studies // Toxicol Appl Pharmacol. – 2007. – 224(3). – P. 290–9.
12. Mishra B., Patel B.B., Tiwari S. Colloidal nanocarriers: are view on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2010. – 6. – P. 9–24.
13. Ortel B., Shea C.R., Calzavara-Pinton P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy // Frontiers in Bioscience. – 2009. – 14. – P. 4157–72.
14. Peng Q., Farrants G.W., Madslie K. et al. Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminium phthalocyanines in a human melanoma cell line // Int. J. Cancer. – 1991. – 49(2). – P. 290–5.

В клинике ЛЛЛФ Тиосенса планируется применять при ФДТ таких опухолевых заболеваний, как рак желудка, кожи, нижней губы, опухолей слизистой оболочки полости рта, языка, при внутрикожных метастазах рака молочной железы и опухолях головного мозга.

В экспериментах на животных было показано, что комбинация фотодинамической терапии с другими методами лечения, например лучевой терапией, химиотерапией и иммунотерапией, значительно повышает эффективность лечения и увеличивает процент случаев излечения животных от опухолевого процесса.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства г. Москвы в рамках научнотехнической программы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний».*

# № 4-2011

К.А. Скрябин, В.С. Косоруков

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ**

**ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....3**

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*А.А. Коломейцева, Е.В. Степанова, И.М. Гагарин, Е.Г. Родникова, Д.С. Рзаев, В.А. Горбунова, А.Ю. Барышников*  
**ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ  
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА  
У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО.....9**

*Н.В. Голубцова, И.Н. Михайлова, К.А. Парсункова, Н.А. Балацкая, К.А. Барышников, И.В. Евсегнеева, М.В. Огородникова, И.В. Манина, И.Н. Григорьева, Е.В. Коржневская, Г.З. Чадава, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин*  
**ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2  
У БОЛЬНЫХ ДИССЕМНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ  
В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ.....13**

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

*А.М. Дейчман*

**О ВОЗМОЖНЫХ НОВЫХ МЕХАНИЗМАХ  
ОБРАЗОВАНИЯ КОРОТКИХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ,  
УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОМА.....17**

*Н.Г. Кормош*

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ  
АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА  
(СУБКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ) – ВЗГЛЯД КЛИНИЦИСТА.....29**

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Н.Н. Семенов, Е.В. Степанова, М.Р. Личиницер*  
**ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИНТЕГРИНОВ  $\alpha_v\beta_3$  И  $\alpha_v\beta_5$ ,  
ПАРАТИРЕОИД-ПОДОБНОГО ГОРМОНА, РЕЦЕПТОРОВ К ПТГП  
ОСТЕОПОНТИНА В РАЗВИТИИ МЕТАСТАЗОВ В КОСТИ  
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПОЧКИ.....37**

*А.Н. Балаев, В.Н. Осипов, К.А. Охманович, В.Е. Федеоров, Е.В. Решетников*  
**ПОЛУЧЕНИЕ Н-РНЕ-D-TRP-LYS(ε-ВОС)-ТНРОМЕ  
– ТЕТРАПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА СИНТЕЗА АНАЛОГОВ СОМАТОСТАТИНА.....43**

*Ю.В. Дутикова, В.А. Ольшевская, А.А. Штиль, Д.Н. Калюжный*  
**НЕ ТОЛЬКО ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ:  
ПОРФИРИНЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ДНК-ЛИГАНДЫ.....47**

*З.С. Смирнова, Е.В. Санарова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, Н.А. Оборотова, О.Л. Орлова,  
А.П. Полозкова, Г.А. Меерович, Е.А. Лукьянец*  
**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ  
С ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМОЙ ТИОСЕНСА  
НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ.....55**

*Т.В. Михайлова, М.А. Барышникова, О.В. Клименко, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин*  
**РАЗРАБОТКА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ.....61**

*Н.А. Оськина, У.А. Боярских, А.Ф. Лазарев, В.Д. Петрова, Д.И. Ганов, О.Г. Тоначева,  
Г.И. Лифшиц, М.Л. Филиппенко*  
**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ЗАМЕН  
В ГЕНЕ РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D  
НА РИСК РАЗВИТИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
В ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ РФ.....67**

*Д.В. Филоненко, М.Б. Бычков, В.А. Горбунова, Е.М. Трещалина*  
**РЕЗУЛЬТАТЫ I ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ  
БИНАРНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ТЕРАФТАЛ + АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА  
У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЕВЫМИ ПЛЕВРИТАМИ.....71**

*Л.Б. Хворостенко, М.Н. Делиханова, В.А. Платицын, О.И. Фролова*  
**ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ  
И ЭРИТРОЦИТОВ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ.....75**

*Д.Ю. Блохин, Г.Ф. Чмутин, П.К. Иванов*  
**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ:  
ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДУЛЯТОРЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ, Ч. II)...81**

**Материалы III Всероссийской научной конференции  
с международным участием «Наноонкология». Саратов, 6–7 сентября 2011 г.....89**

**Содержание «Российского биотерапевтического журнала» за 2011 год.....42; 46; 54; 60**

**Правила оформления статей.....8; 28; 36**

**Список сокращений.....114**

**К 80-летию со дня рождения М.А. Красновой.....117**

УДК 616-006-085:615.371:577.352.2

*Т.В. Михайлова, М.А. Барышников, О.В. Клименко, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин*  
**РАЗРАБОТКА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ**  
 РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

**Контактная информация**

*Михайлова Татьяна Витальевна, научный сотрудник лаборатории НИИ ЭДнТО*

**адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(495)324-1065

**e-mail:** [tania-05@list.ru](mailto:tania-05@list.ru)

Статья поступила: 13.10.2011, принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

Использование липосомальной формы противоопухолевых вакцин позволяет обеспечить сохранность антигенов, способствует повышению иммуногенности и увеличению эффективности доставки антигенов к клеткам иммунной системы. Цель работы – разработка и изучение биофармацевтических свойств липосомальной вакцины, содержащей лизат клеточных линий меланомы, экспрессирующих максимальное количество hsp-70.

Липосомы с лизатом клеточных линий меланомы человека mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Is, mel Z получали методом пассивной загрузки. Был подобран оптимальный режим лиофильного высушивания, обеспечивающий сохранение физико-химических свойств липосом и стабильности hsp-70. Включение hsp-70 в липосомы составило 65 %. Средний размер везикул после регидратации липосом составил 6000 нм. Полученные результаты служат основанием для дальнейшего изучения липосомальной вакцины.

**Ключевые слова:** противоопухолевые вакцины, лиофильная сушка, липосомы, криопротекторы, иммуноблот.

*T.V. Mikhailova, M.A. Baryshnikova, O.V. Klimenko, N.A. Oborotova, A.Yu. Baryshnikov, Yu. V. Shishkin*

**CREATION OF LIPOSOMAL ANTITUMOR VACCINE**

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

**Abstract**

Usage of liposomal forms of antitumor vaccines provides stability of antigens, promotes increase of an immunogenicity and improvement of antigen presentation. The purpose of present research was obtaining of liposomes with lysate of human melanoma cell-line mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Is, mel Z, expressing maximum quantity of hsp-70.

Liposomes were obtained by method of passive loading. Selection of lyophilization technique and size of liposomes analysis were performed. Stability of hsp-70 after lyophilization was shown. Inclusion of hsp-70 in liposomes was 65 %. The average vesicle size after rehydration was 6000 nm. The received results form the basis for further studying of liposomal vaccine.

**Key words:** antitumor vaccines, lyophilization, liposomes, cryoprotector, immunoblot.

**Введение**

В настоящее время активная иммунотерапия при помощи специфических вакцин является признанным методом профилактики и лечения некоторых видов злокачественных новообразований, в том числе меланомы. Основной задачей противоопухолевой вакцинации является индукция и поддержание иммунного ответа, направленного на распознавание и элиминацию иммунорезистентных опухолевых клеток [1; 2]. Меланома считается «антигенной опухолью», экспрессирующей опухолеассоциированные антигены, в том числе – белки теплового шока. Уровень экспрессии белка теплового шока hsp70 имеет прогностическое значение в опухолях различного типа и используется для стимуляции иммунного ответа при вакцинотерапии злокачественных новообразований [3]. Современные исследования в области создания противоопухолевых вакцин включают два основных направления: совершенствование существующих технологических этапов и разработку нового поколения вакцин на основе достижений молекулярной биологии и иммунологии. Использование липосомальных препаратов – одно из наиболее активно развивающихся направлений в медицине [8]. Способность липосом включать в себя различные вещества практически без каких-либо ограничений в отношении их химической природы, свойств и размера моле-

кул дает поистине уникальные возможности для решения многих медицинских проблем [4; 9; 10]. Липосомальная форма вакцины обеспечивает сохранность антигенов, увеличивает эффективность доставки антигенов к клеткам иммунной системы и способствует повышению иммуногенности [11]. Для достижения длительной стабильности липосомальных препаратов используется сублимационная сушка [6]. В процессе лиофилизации происходит удаление воды из системы, что предотвращает гидролиз фосфолипидов. В результате получается твердый продукт с низкой молекулярной подвижностью, что также ведет к подавлению химической и физической нестабильности [5; 7].

**Цель работы** – разработка липосомальной вакцины, содержащей лизат клеточных линий меланомы, экспрессирующих максимальное количество hsp-70, и изучение ее биофармацевтических свойств.

**Материалы и методы****Препараты и реактивы**

Фосфатидилхолин (Lipoid); холестерин (Sigma); а-токоферола ацетат PN №-001153/01-2002 10%-ный раствор в масле (ОАО «ICN Марбиофарм»); хлороформ (Химмед); сахароза (ГОСТ 5833-75); физиологический раствор NaCl 0,9%-ный (Химмед); Sephadex G-50 superfine (Amersham Biosciences).

Акриламид/бис-акриламид 30%-ный раствор (Sigma); электродный буфер – 10× Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad); буфер для проб Laemmli Sample 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 и аппаратура

Электронные весы Sartorius LA 1200 S; роторный испаритель с водяной баней (BUCHI Rotavapor R-200); ультрацентрифуга Optima TLX (Beckman Coulter); хроматографическая колонка C 4/16; детектор UVIS-920; рекордер REC 111 (Amersham Biosciences); сублимационная установка CHRIST GAMMA 2-16 LSC; анализатор влажности Sartorius MA 100.

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

#### Получение лизатов

##### клеточных линий меланомы

Клетки линий mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Is, mel Z из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина PAMH культивировали в полной питательной среде RPMI 1640 с 10%-ной ТЭС.

Для получения опухолевого лизата 10 млн клеток в физиологическом растворе NaCl разрушали 5 циклами замораживания в жидком азоте и оттаивания при t=40 °С. Разрушенные клетки осадили центрифугированием (10 мин при 3000 g). Супернатант отбирали и использовали для постановки электрофореза по стандартной методике [10]. Анализируемые белки растворяли в буфере для проб, 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 %-ный реагент Tween 20 (Bio-Rad). Затем мембрану дважды отмывали в 20 мл буфера Б по 10 мин.

Далее проводили инкубацию с антителами Mouse anti-heat shock Protein 70 Monoclonal Ig G (Abfrontier), 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.

#### Получение липосом с клеточным лизатом

Экспериментальные серии липосомальной вакцины готовили следующим образом: навески лецитина и холестерина (мольное соотношение компонентов 7 : 3) растворяли в небольшом объеме хлороформа.

Получали дисперсию с конечной концентрацией липидов 20 мг/мл. Для предотвращения окисления липидов добавляли антиоксидант – α-токоферола ацетат в количестве 0,01% от общего количества липидов.

Полученную смесь липидов выдерживали, периодически помешивая, до полного растворения липидов. После полного растворения липидов колбу присоединяли к роторному испарителю и на водяной бане при температуре +40 °С и пониженном давлении, создаваемом водоструйным насосом (4±2 мм рт.ст.), проводили выпаривание хлороформа. После полного удаления органического растворителя на стенках колбы образовывалась тонкая пленка фосфолипидов.

В качестве криопротектора использовали сахарозу в концентрации 10%. Для этого сахарозу растворяли в 0,9%-ном изотоническом растворе. Затем к раствору сахарозы прибавляли клеточный лизат в различных соотношениях лизат : липиды (1 : 5; 1 : 10; 1 : 20 по объему).

Образовавшуюся липидную пленку смывали этим раствором со стенок колбы при температуре 38 °С до образования белой эмульсии (дисперсия многослойных липосом). Включение лизата проходило по принципу пассивной загрузки.

#### Количественное определение содержания лизата в липосомах

Определение процента включения белка в липосомы проводили методом спектрофотометрии при длине волн 260 нм и 280 нм.

Отделение липосом с лизатом от невключившихся белков проводили ультрацентрифугированием при 50 тыс об/мин в течение 15 мин. Супернатант, содержащий невключившийся антиген, декантировали, а осадок липосом ресуспендировали в физиологическом растворе и снова центрифугировали.

Процесс промывания липосом повторяли до удаления остаточного количества белка в супернатанте, содержание которого контролировали на спектрофотометре.

После последнего центрифугирования осадок липосом ресуспендировали в требуемом объеме физиологического раствора, после чего разрушали 5 %-ным р-ром Тритона X-100. Концентрацию белка (С, мг/мл) рассчитывали по формуле:

$$C = (1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}) \times P_i, \text{ где}$$

A<sub>260</sub> и A<sub>280</sub> – оптическая плотность разведенного раствора при 260 нм и 280 нм соответственно;

P<sub>i</sub> – разведение.

Эффективность включения белка (В, %) рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{(C \times 100\%)}{C_{исх}}, \text{ где}$$

С – концентрация белка, определенная после разрушения липосом;

С<sub>исх.</sub> – концентрация белка при включении в липосомы.

**Определение режима лиофильного высушивания липосомального лизата**

Для стабилизации липосомального лизата проводили сублимационную сушку с использованием в качестве криопротектора 10 %-ного раствора сахарозы. 2 мл липосомальной дисперсии во флаконах вместимостью 20 мл из стекла НС-1 помещали на полку в камеру сублимационной установки CHRIST GAMMA 2-16 LSC для замораживания и последующей лиофилизации (толщина слоя составляла 6–7 мм).

На каждом этапе процесса сублимационного высушивания проводили исследование препарата с целью контроля физико-химических характеристик и иммуногенности.

**Исследование процента нагрузки белка в липосомы методом гель-хроматографии**

Для определения степени включения антигенов в липосомы использовали метод эксклюзионной хроматографии.

Суть метода заключается в хроматографическом разделении жидкого липосомального препарата на липосомальную («высокомолекулярную») и нелипосомальную («низкомолекулярную») фракции с последующим определением концентрации белка методом спектрофотометрии.

Количество включенного в липосомы белка вычисляли по разности общего содержания белка в препарате и содержания белка в нелипосомальной фракции.

Жидкий липосомальный препарат с предварительно известным содержанием белка готовили путем диспергирования сухого липосомального препарата в физиологическом растворе с рН 7,2 из расчета 1 г препарата на 10 мл раствора. Диспергирование проводили при энергичном встряхивании в течение 3 мин.

Хроматографическое разделение препарата проводили на сорбенте Sephadex G-50. Разделение проводили на колонке 1 см × 16 см при скорости движения элюента (физиологический раствор с рН 7,2) 2 мл/мин с детекцией при 280 нм. В первой фракции содержались липосомы, нагруженные лизатом. В ходе разделения отбирали нелипидную фракцию, в которой затем спектрофотометрически определяли содержание белка. Эффективность включения лизата в липосомы (В, %) рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{D_1 \times v_1 \times V_1}{D \times v \times V} \times 100\% , \text{ где}$$

$D_1$  – оптическая плотность раствора фракции с очищенным липосомами с лизатом;

$D$  – оптическая плотность раствора исходной липосомальной дисперсии;

$v_1$  – объем фракции с очищенным липосомальным лизатом, мл;

$v$  – объем исходной липосомальной дисперсии, нанесенной на колонку, мл;

$V_1$  – величина разбавления фракции с очищенным липосомальным лизатом;

$V$  – величина разбавления исходной липосомальной дисперсии.

**Определение остаточной влажности методом термобарометрии**

Остаточную влажность рассчитывали по формуле:

$$W = \frac{m_1 + m_2}{m_1} \times 100\% , \text{ где}$$

$m_1$  – исходный вес образца,  $m_2$  – вес образца после высушивания.

**Определение размера липосом методом оптической микроскопии**

Размеры липосом определяли методом оптической микроскопии с помощью интерференционно-поляризационного микроскопа иммерсионным методом. Использовали оптический микроскоп МРІ-3, увеличение ×20.

Пробу для микроскопирования готовили путем тщательного диспергирования 5 мг препарата в 5 мл инертной дисперсионной среды. В качестве дисперсионной среды использовали вазелиновое масло.

Каплю полученной суспензии наносили на предметное стекло пипеткой. Измеряли и изучали не менее 200 частиц, если частицы различались по размерам в несколько десятков раз, и 1000 частиц при большей полидисперсности образца.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием компьютерной программы «BIOSTAT» (Version 3.2), Microsoft Excel, Statistica v. 5.0. Статистически достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

Для приготовления лизата были выбраны клетки линий меланомы человека, экспрессирующие наибольшее количество hsp-70 – mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Is, mel Z [3]. Концентрация белка после лизиса 10 млн клеток составила 2,5 мг/мл.

Исследование сочетаемости лизата клеточных линий меланомы и липидов, из которых готовили липосомы, показало их хорошую совместимость. Изучение соотношения «антиген – липиды» показало, что наилучшим являлось соотношение 1:10, обеспечивающее наибольшую стабильность препарата. Был определен оптимальный режим приготовления липосом с лизатом клеточных линий меланомы: диспергирование в течение 2 мин при механическом встряхивании и температуре смеси +38–42 °С.

При микроскопическом исследовании полученного липосомального препарата было установлено, что образующийся комплекс «белки – липосомы» представлял собой расположенные равномерно в поле зрения многослойные везикулы, размером от 100 до 100 000 нм, во внутренней объем которых были включены белки (рис. 1). В процессе лиофильного высушивания липосомального лизата оценивали влияние температурного режима сушки на качество готового препарата: его внешний вид (цвет, пористость, однородность), физико-химические характеристики (скорость растворения или ресуспендирования, размер везикул и т.п.). В случае режима 1 флаконы с препаратом загружали на полки сублимационной камеры при температуре +20 °С, охлаждали их до температуры –70 °С и минимальном давлении в камере  $(4,0-6,0) \times 10^{-2}$  мБар в течение 3 ч, далее их нагревали от –70 °С до +20 °С со скоростью 4–5 °С/ч. После достижения препаратом температуры +20 °С (минимальное давление в камере  $4,0 \times 10^{-2}$  мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 3 ч. Лиофилизация продолжалась 27 ч.

Таблица

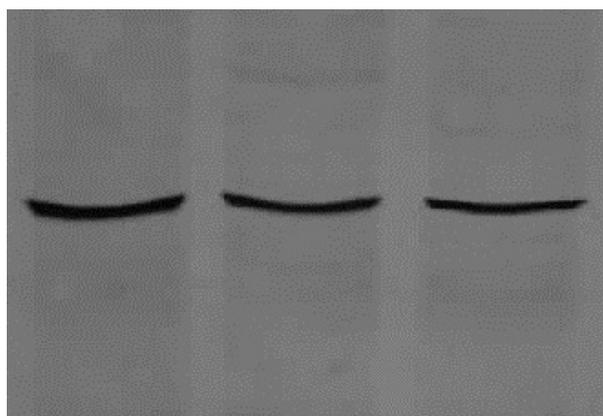
Температурные режимы лиофилизации				Средний размер везикул, нм		
№	°С			До лиофилизации	После регидратации	
	Предварительное замораживание	Основная сушка	Вторичная сушка		Без криопротектора	С криопротектором
1	-70	-50	-30	5500	15000	6000
2	-50	-40	-25	5500	17000	7500
3	-30	-20	-10	5500	18000	9000

В случае режима 2 флаконы с препаратом помещали на полки и выдерживали при температуре  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  и минимальном давлении в камере  $(4,0\text{--}6,0)\times 10^{-2}$  мБар в течение 2 ч, далее их нагревали от  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ . После достижения препаратом температуры  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (минимальное давление в камере  $4,0\times 10^{-2}$  мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 3 ч. Лиофилизация продолжалась 23 ч.

В случае режима 3 флаконы с препаратом помещали на полки и выдерживали при температуре  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  и минимальном давлении в камере  $4,0\text{--}6,0\times 10^{-2}$  мБар в течение 1,5 ч, далее их нагревали от  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $4\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ . После достижения препаратом температуры  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (минимальное давление в камере  $4,0\times 10^{-2}$  мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 3 ч. Лиофилизация продолжалась 19 ч.

На основании проведенных исследований оптимальным признан режим 1 с использованием 10% раствора сахарозы в качестве криопротектора (см. табл.). После лиофильного высушивания препарат представлял собой однородный мелкодисперсный порошок, хорошо диспергирующийся в воде (см. вклейку; рис. 1).

Включение hsp-70 в липосомы, определенное методом иммуноблот с последующей обработкой программой Syngene, составило 73 % до лиофильного высушивания и 65 % после лиофильного высушивания в сравнении с исходным лизатом (рис. 2).



1 2 3

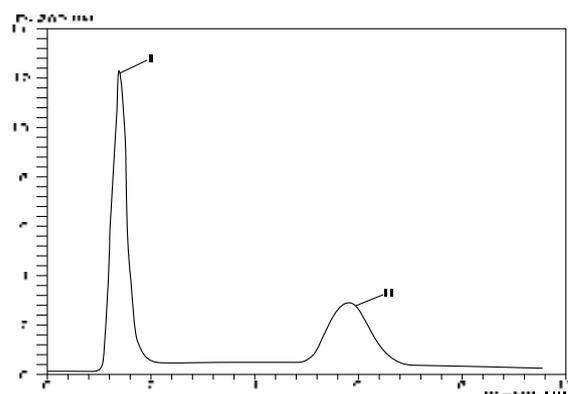
**Рис. 2.** Определение hsp-70 до и после лиофилизации липосомальной вакцины методом иммуноблот:

- 1 – лизат клеточных линий mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Is, mel Z (контроль);
- 2 – лизат, включившийся в липосомы до лиофильного высушивания;
- 3 – лизат, включившийся в липосомы после регидратации лиофильно-высушенных липосом.

Включение лизата, определенное методом гель-хроматографии, составило 54 %. Невысокий показатель можно объяснить возможными потерями белка из-за наличия крупных белково-липидных комплексов, не полностью проходящих сквозь сорбент в хроматографической колонке (рис. 3).

Содержание остаточной влаги в образцах не превышало 1,3 %. Образцы вакцины с различной остаточной влажностью заложены на хранение при температурах  $+4\text{--}6\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

В процессе хранения оценивается состояние порошка (слеживаемость, сыпучесть), изменения его реологических характеристик, перекисного окисления липидов, а также изменение биологической активности образцов методом иммуноблот.



**Рис. 3.** Хроматограмма разделения липосомальной вакцины, регидратированной в физиологическом растворе (скорость движения бумаги в рекордере 2 мм/мин., элюент – физиологический раствор NaCl 0,9%):

- I – фракция очищенных липосом с клеточным лизатом;
- II – нелипосомальная фракция.

### Выводы

1. Получены липосомы с лизатом клеточных линий меланомы mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Is, mel Z.
2. На основании выбранного состава и технологии получения липосом оптимизирован режим сублимационной сушки, обеспечивающий сохранение физико-химических свойств липосом.
3. Методом иммуноблот показано, что после лиофильного высушивания липосомальной вакцины сохраняется стабильность белка hsp-70 и высокая степень нагрузки лизата в липосомы.
4. Показано, что после регидратации происходит восстановление формы и размеров везикул липосомальной вакцины.

## Литература

1. Бистрин Ж.-К., Оратц Р., Шапиро Р. Вакцины из частично очищенных опухолевых антигенов. Биологические методы лечения онкологических заболеваний: принципы и практическое применение / Под ред. Винсента Т. Де Вита мл., С. Хеллмана, С.А. Розенберга. – М.: Медицина, 2002. – С. 687–97.
2. 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.
3. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение уровня экспрессии hsp70 на клеточных линиях меланомы человека // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–48.
4. Afzal R. Mohammed, Vincent W. Bramwell<sup>a</sup>, Allan G.A. Coombes<sup>b</sup> and Yvonne Perrie Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products // Methods – 2006. – 40(1). – P. 30–8.
5. Chengjun Chen, Dandan Han, Cuifang Cai, Xing Tang. An overview of liposome lyophilization and its future potential // J. of Controlled Release. – 2010. – 142. – P. 299–311.
6. Crowe H., Crowe L.M. Factors affecting the stability of dry liposomes // Biochim. Biophys Acta. – 1988. – 939. – P. 327–34.
7. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery progress and problems // Tibtech – 1995. – 13. – P. 527–37.
8. Mohammad Riaz. Liposome es preparation methods // Pakistan Journal of Pharm. Sciences. – 1996. – 19(1). – P. 65–77.
9. Subhash C. Basu, Manju Basu. Methods in Molecular Biology // Liposome Methods and Protocols. – 2010. – 199. – P. 59–85.
10. Volkman Weissig. Liposomes Methods and Protocols // Biological membrane models. – 2010. – 2. – P. 241–50.
11. Zhengua Zhong, Xin Wei, Baowen Q. et al. A novel liposomal vaccine improves humoral immunity and prevents tumor pulmonary metastasis in mice // Int.J.Pharm. – 2010. – 399(1-2) – P. 156–62.

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



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



УДК 577.16.08:616.65-006.6-036.2(517.12/.17)

*Н.А. Оськина<sup>1</sup>, У.А. Боярских<sup>1</sup>, А.Ф. Лазарев<sup>2</sup>, В.Д. Петрова<sup>2</sup>, Д.И. Ганов<sup>2</sup>, О.Г. Тоначева<sup>3</sup>,  
Г.И. Лифшиц<sup>1</sup>, М.Л. Филипенко<sup>1</sup>*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ЗАМЕН  
В ГЕНЕ РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D  
НА РИСК РАЗВИТИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
В ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ РФ**

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул

<sup>3</sup>Красноярский краевой онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского, Красноярск

**Контактная информация:**

*Оськина Наталья Александровна, аспирант группы фармакогеномики*

**адрес:** 630090, Новосибирск, Лаврентьева 8; **тел.** +7(383)363-5171, **факс** +7(383)363-5117

**e-mail:** [nattasha.o@gmail.com](mailto:nattasha.o@gmail.com)

Статья поступила: 11.01.2011, принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

В настоящей работе нами было изучено влияние однонуклеотидных полиморфных замен rs2228570 и rs2238135 в гене рецептора витамина D на риск развития рака предстательной железы в Западно-Сибирском регионе РФ. С этой целью мы сравнили частоту встречаемости данных аллельных вариантов в группе больных раком простаты (393) и в контрольной группе (384). Генотипирование осуществляли методом real-time ПЦР с использованием конкурирующих TaqMan зондов. Ни для одного из исследуемых вариантов не получено статистически значимой ассоциации с риском развития рака предстательной железы: OR(C.I.95%)=0,99 (0,81–1,21), p=0,9 для T-аллеля rs2228570 и OR(C.I.95%)=0,93 (0,75–1,16), p=0,5 для C-аллеля rs2238135. Анализ частоты встречаемости в контрольной и исследуемой группах гаплотипов rs2228570-rs2238135 также не показал статистически значимой ассоциации с риском развития заболевания. Результаты проведенного исследования свидетельствуют об отсутствии влияния полиморфных замен rs2228570 и rs2238135 на риск развития рака простаты в Западно-Сибирском регионе РФ.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, однонуклеотидная полиморфная замена (SNP), рецептор витамина D (VDR), витамин D.

*N.A. Oskina<sup>1</sup>, U.A. Boyarskikh<sup>1</sup>, A.F. Lazarev<sup>2</sup>, V.D. Petrova<sup>2</sup>, D.I. Ganov<sup>2</sup>, O.G. Tonacheva<sup>3</sup>,  
G.I. Lifshits<sup>1</sup>, M.L. Filipenko<sup>1</sup>*

**VITAMIN D RECEPTOR POLYMORPHISMS  
AND RISK OF PROSTATE CANCER  
IN THE WEST SIBERIA**

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Basic Medicine, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

<sup>2</sup>Altai Affiliated Department of N.N. Blokhin Cancer Research Center of RAMS, Barnaul

<sup>3</sup>Krasnoyarsk regional oncologic centre, Krasnoyarsk

**Abstract**

In this study we have analyzed the association of the VDR gene polymorphisms (rs2228570 and rs2238135) with prostate cancer in patients residing in the West Siberia. 393 DNA samples of Caucasian men with PC were enrolled in this study. Control group consisted of 384 Caucasian men without a history of cancer. Genotyping was carried out by real-time PCR using competitive TaqMan probes. Our data indicate that SNPs did not show any association with risk of prostate cancer: OR(C.I.95%)=0.99 (0.81–1.21), p=0.9 for T-allele of rs2228570 and OR(C.I.95%)=0.93 (0.75–1.16), p=0.5 for the C-allele of rs2238135. Analysis of haplotype rs2228570-rs2238135 in the control and case groups also did not show statistically significant association with risk of prostate cancer. Based on the data obtained, we conclude that genetic polymorphisms in VDR do not increase the risk for prostate cancer.

**Key words:** prostate cancer, single-nucleotide polymorphism (SNP), vitamin D receptor (VDR), vitamin D.

**Введение**

В ходе ряда эпидемиологических исследований было установлено, что заболеваемость (РПЖ) в северных регионах намного выше, чем в южных [4; 33; 38]. G.G. Schwartz и B.S. Hulka предположили, что данный факт связан с более высоким уровнем инсоляции в южных регионах, а поскольку ультрафиолетовое излучение индуцирует синтез провитамина D в кератиноцитах, авторы в 1990 г. сформулировали гипотезу, согласно которой активные метаболиты витамина D обладают протективным эффектом в отношении развития РПЖ [33]. Стоит отметить, что после-

дующие исследования взаимосвязи уровня метаболитов витамина D с заболеваемостью РПЖ оказались весьма противоречивыми: в ряде исследований была получена корреляция между сывороточным уровнем метаболитов витамина D и заболеваемостью РПЖ [1; 2; 7; 10; 21; 23], в части опубликованных работ такой ассоциации обнаружено не было [9; 18; 28; 31; 37]. Противоречия в результатах исследований могут объясняться изначально существующим различием концентраций витамина D в крови в разных популяциях [37]. Кроме того, однократный забор крови для исследования не может отражать статус человека по витамину D в течении жизни.

Эффекты витамина D опосредуются через рецептор витамина D (VDR), который был обнаружен как в нормальных, так и малигнизированных клетках предстательной железы [25]. Наиболее биологически активным является метаболит витамина D<sub>3</sub> – 1,25-дигидрооксихолекальциферол (кальцитриол), обладающий наибольшим сродством к VDR [20]. Считалось, что основным источником витамина D<sub>3</sub> является его синтез в коже под действием ультрафиолетового излучения. Однако в 1998 г. G.G. Schwartz с соавт. опубликовали данные о способности клеток предстательной железы самостоятельно синтезировать 1,25-дигидрооксихолекальциферол [35].

Впервые экспериментальные данные о роли кальцитриола в развитии РПЖ опубликовал G.J. Miller с соавт. в 1992 г. Используя клеточную линию LNCaP, они показали, что кальцитриол стимулирует дифференцировку клеток предстательной железы [25]. При дальнейшем исследовании эффектов кальцитриола было обнаружено, что он ингибирует клеточную пролиферацию [16; 26], оказывает антиинвазивный [34] и антиметастатический [22] эффекты при развитии опухоли.

Поскольку VDR является ключевым посредником клеточных эффектов активных метаболитов витамина D, было высказано предположение, что полиморфные варианты (SNPs) гена VDR могут влиять на риск развития РПЖ. Нами не было найдено отечественных исследований ассоциации аллельных вариантов данного гена с риском развития РПЖ, в тоже время, проведенные зарубежные исследования остаются весьма противоречивыми [3; 5; 8; 13–15; 17; 19; 21; 23; 24; 29; 36; 40].

Цель настоящей работы – оценить влияние полиморфных вариантов гена рецептора витамина D rs2228570 (более известен под именем FokI) и rs2238135 на риск развития РПЖ в Западно-Сибирском регионе РФ.

## Материалы и методы

### Описание выборки

Было проведено исследование с участием 777 мужчин, принадлежащих к русской этнической группе, проживающих на территории Алтайского и Красноярского краев РФ. Образцы венозной крови для выделения ДНК были предоставлены сотрудниками Алтайского филиала Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН и Красноярского краевого онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского. ДНК выделяли из венозной крови с использованием стандартной процедуры, включающей выделение и лизис клеток крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку ДНК экстракцией примесей фенол-хлороформом и осаждение ДНК этанолом. Сформировано две группы мужчин: исследуемая группа – 393 человека и контрольная группа – 384 человека. В исследуемую группу вошли мужчины с гистологически верифицированным РПЖ. Критерием отбора в контрольную группу служило отсутствие онкологических заболеваний в анамнезе. Средний возраст исследуемой выборки составил 69,0±8,0 лет, контрольной – 59,0±17,0 лет. Исследуемая выборка была представлена в основном спорадическими формами РПЖ,отягощенный семейный анамнез отмечен лишь у 6 больных (1,5 %).

### Генотипирование

Определение генотипов исследуемых аллельных вариантов выполнялось методом ПЦР в

режиме реального времени с использованием TaqMan-зондов, комплементарных полиморфной последовательности ДНК. Амплификация проводилась в объеме 25 мкл, ПЦР-смесь включала в себя 300 нМ праймеры, 100 нМ TaqMan-зонды, 65 мМ TrisHCl (pH 8,9), 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 0,5–10 нг ДНК и 0,5 U Taq-ДНК полимеразы (hot-start, Biosan, ИВБФМ). Структуры олигонуклеотидных праймеров и зондов приведены в табл. 1. ПЦР проводилась в следующих условиях: начальная денатурация 3 мин при 96 °С; затем 48 циклов, включающих денатурацию при 96 °С – 5 с, отжиг праймеров и последующую элонгацию при 61 °С – 30 с (каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала на длине волны эмиссии флуорофоров FAM и R6G).

### Статистический анализ

Соответствие частот генотипов исследуемых SNP's равновесию Харди–Вайнберга определяли отдельно для контрольной группы и группы пациентов с РПЖ при помощи точного критерия Фишера [39]. Для определения вклада исследуемого SNP в изменение риска развития рака предстательной железы рассчитывали отношение шансов (OR) и его доверительный интервал (С.И., ДИ 95 %). Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов проводили с использованием критерия  $\chi^2$ , статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Вычисления производились с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

### Результаты и обсуждение

В результате настоящего исследования были определены частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов rs2228570 (FokI) и rs2238135 в контрольной группе и группе пациентов с РПЖ. В обеих группах частоты генотипов соответствовали распределению Харди–Вайнберга (табл. 2). Проведенное нами исследование не выявило статистически значимой ассоциации исследуемых полиморфных замен с риском развития РПЖ. Результаты сравнения частот встречаемости аллелей и генотипов исследуемых SNP's в анализируемых группах представлены в табл. 2. Анализ гаплотипов для rs2228570-rs2238135 также не показал статистически значимой ассоциации с риском развития РПЖ (табл. 3). Ген VDR локализуется на хромосоме 12q12–q14 и содержит 11 экзонов [27]. SNP rs2228570 (Т/С) расположен в первом из двух стартовых (ATG) кодонов 2-го экзона, которые разделены между собой тремя кодонами. В результате полиморфной замены (ACG) трансляция начинается со второго стартового кодона, что приводит к синтезу белка на три аминокислоты короче [11]. Кальцитриол связывается с VDR, образуя гетеродимерный комплекс, который впоследствии взаимодействует с респонсивным элементом витамина D и регулирует транскрипцию множества генов, включая p21, p27, c-fos и c-myc, которые участвуют в процессах клеточного роста и дифференцировки [26]. При наличии полиморфной замены FokI транскрипционная активность гетеродимерного комплекса снижается [12]. Опубликовано множество исследований ассоциации данной полиморфной замены с риском развития РПЖ, полученные результаты неоднозначны. В ряде исследований обнаружена корреляция полиморфной замены с заболеваемостью РПЖ [3; 19; 30; 40], в ряде – нет [5; 6; 8; 29].

Таблица 1

Последовательности праймеров и TaqMan-зондов

SNP	Праймеры	Зонды
FokI rs2228570 (C/T)	U 5'-tgccactgactctggctctg-3' R 5'-gttccggtaacaagtctccag-3'	5'R6G- cattgcctccctccctgtaag -BHQ-3' 5'FAM- cattgcctccatccctgtaag -BHQ-3'
rs2238135 (C/G)	U 5'-ccccaggaaccaccacttg-3' R 5'-tttagccctcacaacagtctg-3'	5'R6G-ctagctgtggaccctgg-BHQ-3' 5'FAM-ctagctgtggaccctgg-BHQ-3'

Таблица 2

Анализ ассоциации полиморфных локусов rs2228570 и rs2238135 гена рецептора витамина D с риском развития РПЖ

dbSNP rs <sup>1</sup>	Свойства	Контроль (n)	РПЖ (n)	OR(95% CI)	p	X-B p(exact) <sup>2</sup>
FokI rs2228570	генотип	–	–	–	–	0,08
	CC	112	109	референтный генотип	–	
	CT	172	191	1,14 (0,82-1,6)	0,44	
	TT	96	90	0,96 (0,65-1,42)	0,85	
	аллель	n (%)	n (%)	–	–	
	C	396 (52)	409 (52)	референтный аллель	–	
T	364 (48)	371 (48)	0,99 (0,81-1,21)	0,9		
rs2238135	генотип	–	–	–	–	0,72
	GG	181	199	референтный генотип	–	
	GC	159	153	0,88 (0,65-1,18)	0,38	
	CC	38	39	0,93 (0,57-1,52)	0,78	
	аллель	n (%)	n (%)	–	–	
	G	521 (69)	551 (70)	референтный аллель	–	
C	235 (31)	231 (30)	0,93 (0,75-1,16)	0,5		

<sup>1</sup>идентификационный номер SNP в международной базе данных NCBI dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>.<sup>2</sup>X-B p(exact): уровень статистической значимости отклонения частот генотипов в контрольной группе от равновесия Харди-Вайнберга.

Таблица 3

Анализ ассоциации гаплотипов полиморфных вариантов rs2228570-rs2238135 гена рецептора витамина D с риском развития РПЖ

Гаплотип	Частота		OR (95% CI)	p
	Больные	Контроль		
CG	0,38	0,35	референтный гаплотип	–
CC	0,15	0,17	0,78 (0,55-1,11)	0,17
TC	0,15	0,14	1,0 (0,73-1,38)	0,99
TG	0,33	0,34	0,88 (0,68-1,15)	0,35

Проведенный S. Raimondi с соавт. мета-анализ, включавший результаты 15 исследований ассоциации полиморфной замены FokI с риском развития РПЖ, статистически значимой ассоциации не выявил (OR=1,03; 95% C.I.=0,95–1,12; p=0,21) [32].

Полиморфная замена rs2238135 (G/C) расположена в 3-м интроне гена VDR, ее функциональная роль на сегодняшний день не достаточно ясна. Предполагается, что данный SNP находится в неравновесном сцеплении с функциональными аллельными вариантами гена VDR [17].

Исследований влияния данной аллельной замены на риск развития РПЖ крайне мало. Нами найдена лишь одна опубликованная работа, в которой получена статистически значимая ассоциация с риском развития РПЖ для данного SNP при исследовании 1195 американцев (OR=1,95; 95 %-ный C.I.=1,17–3,26; p=0,007) [17].

Стоит отметить, что при заявленном объеме выборки нашего исследования с 80% уровнем статистической мощности можно детектировать значения OR не ниже 1,31 для rs2228570 и не ниже 1,36 для rs2238135.

### Литература

- Ahn J., Peters U., Albanes D. et al. Serum vitamin D concentration and prostate cancer risk: a nested case-control study // J Natl Cancer Inst. – 2008. – 100(11). – P. 796–804.
- Ahonen M.H., Tenkanen L., Teppo L. et al. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland) // Cancer Causes Control. – 2000. – 11(9). – P. 847–52.

Другими словами, если предположить, что рассмотренные в нашей работе SNPs изменяют риск РПЖ в 1,3 раза или менее, то с вероятностью более 20% мы не обнаруживаем статистически значимой ассоциации на нашей выборке. Следовательно, если влияние SNPs rs2228570 и rs2238135 на риск РПЖ все же есть, то оно может быть выявлено только при исследовании выборки большего размера.

### Выводы

Таким образом, результат проведенного исследования свидетельствует либо об отсутствии вклада полиморфных замен rs2228570 (FokI) и rs2238135 гена рецептора витамина D на риск развития рака простаты в Западно-Сибирском регионе России, либо их роль в развитии заболевания невелика и нам недостаточно статистической мощности для детекции потенциально существующей ассоциации. Кроме того, возможно, что эффекты данных SNPs зависят от сывороточного уровня витамина D, что не учитывалось в данной работе.

Работа поддержана грантом № 21.25 программы «Фундаментальная наука медицине» СО РАН.

3. *Bodiwala D., Luscombe C.J., French M.E. et al.* Polymorphisms in the vitamin D receptor gene, ultraviolet radiation, and susceptibility to prostate cancer // *Environ Mol Mutagen.* – 2004. – 43(2). – P. 121–7.
4. *Bodiwala D., Luscombe C.J., Liu S. et al.* Prostate cancer risk and exposure to ultraviolet radiation: further support for the protective effect of sunlight // *Cancer Lett.* – 2003. – 192(2). – P. 145–9.
5. *Cheteri M.B., Stanford J.L., Friedrichsen D.M. et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms and prostate cancer risk // *Prostate.* – 2004. – 59(4). – P. 409–18.
6. *Chokkalingam A.P., McGlynn K.A., Gao Y.T. et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms, insulin-like growth factors, and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China // *Cancer Res.* – 2001. – 61(11). – P. 4333–6.
7. *Corder E.H., Guess H.A., Hulka B.S. et al.* Vitamin D and prostate cancer: a prediagnostic study with stored sera // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 1993. – 2(5). – P. 467–72.
8. *Correa-Cerro L., Berthon P., Hausler J. et al.* Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer // *Hum Genet.* – 1999. – 105(3). – P. 281–7.
9. *Gann P.H., Ma J., Hennekens C.H. et al.* Circulating vitamin D metabolites in relation to subsequent development of prostate cancer // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 1996. – 5(2). – P. 121–6.
10. *Giovannucci E., Liu Y., Rimm E.B. et al.* Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men // *J Natl Cancer Inst.* – 2006. – 98(7). – P. 451–9.
11. *Gross C., Eccleshall T.R., Malloy P.J. et al.* The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women // *J Bone Miner Res.* – 1996. – 11(12). – P. 1850–5.
12. *Gross C., Krishnan A.V., Malloy P.J. et al.* The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants // *J Bone Miner Res.* – 1998. – 13(11). – P. 1691–9.
13. *Gsur A., Madersbacher S., Haidinger G. et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism and prostate cancer risk // *Prostate.* – 2002. – 51(1). – P. 30–4.
14. *Habuchi T., Suzuki T., Sasaki R. et al.* Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population // *Cancer Res.* – 2000. – 60(2). – P. 305–8.
15. *15. Hamasaki T., Inatomi H., Katoh T. et al.* Clinical and pathological significance of vitamin D receptor gene polymorphism for prostate cancer which is associated with a higher mortality in Japanese // *Endocr J.* – 2001. – 48(5). – P. 543–9.
16. *Hansen C.M., Binderup L., Hamberg K.J. et al.* Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)2D3 and its analogs on growth control and tumorigenesis // *Front Biosci.* – 2001. – 6. – P. D820–848.
17. *Holick C.N., Stanford J.L., Kwon E.M. et al.* Comprehensive association analysis of the vitamin D pathway genes, VDR, CYP27B1, and CYP24A1, in prostate cancer // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2007. – 16(10). – P. 1990–9.
18. *Jacobs E.T., Giuliano A.R., Martinez M.E. et al.* Plasma levels of 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D and the risk of prostate cancer // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2004. – 89–90(1–5). – P. 533–7.
19. *John E.M., Schwartz G.G., Koo J. et al.* Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer // *Cancer Res.* – 2005. – 65(12). – P. 5470–9.
20. *Konety B.R., Schwartz G.G., Acierno J.S., Jr. et al.* The role of vitamin D in normal prostate growth and differentiation // *Cell Growth Differ.* – 1996. – 7(11). – P. 1563–70.
21. *Li H., Stampfer M.J., Hollis J.B. et al.* A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor polymorphisms, and prostate cancer // *PLoS Med.* – 2007. – 4(3). – P. e103.
22. *Lokeshwar B.L., Schwartz G.G., Selzer M.G. et al.* Inhibition of prostate cancer metastasis in vivo: a comparison of 1,23-dihydroxyvitamin D (calcitriol) and EB1089 // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 1999. – 8(3). – P. 241–8.
23. *Ma J., Stampfer M.J., Gann P.H. et al.* Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in United States physicians // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 1998. – 7(5). – P. 385–90.
24. *Medeiros R., Morais A., Vasconcelos A. et al.* The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the susceptibility to prostate cancer of a southern European population // *J Hum Genet.* – 2002. – 47(8). – P. 413–8.
25. *Miller G.J., Stapleton G.E., Ferrara J.A. et al.* The human prostatic carcinoma cell line LNCaP expresses biologically active, specific receptors for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 // *Cancer Res.* – 1992. – 52(3). – P. 515–20.
26. *Miller G.J., Stapleton G.E., Hedlund T.E. et al.* Vitamin D receptor expression, 24-hydroxylase activity, and inhibition of growth by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in seven human prostatic carcinoma cell lines // *Clin Cancer Res.* – 1995. – 1(9). – P. 997–1003.
27. *Miyamoto K., Kesterson R.A., Yamamoto H. et al.* Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter // *Mol Endocrinol.* – 1997. – 11(8). – P. 1165–79.
28. *Nomura A.M., Stemmermann G.N., Lee J. et al.* Serum vitamin D metabolite levels and the subsequent development of prostate cancer (Hawaii, United States) // *Cancer Causes Control.* – 1998. – 9(4). – P. 425–32.
29. *Ntais C., Polycarpou A., and Ioannidis J.P.* Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2003. – 12(12). – P. 1395–402.
30. *Oakley-Girvan I., Feldman D., Eccleshall T.R. et al.* Risk of early-onset prostate cancer in relation to germ line polymorphisms of the vitamin D receptor // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2004. – 13(8). – P. 1325–30.
31. *Platz E.A., Leitzmann M.F., Hollis B.W. et al.* Plasma 1,25-dihydroxy- and 25-hydroxyvitamin D and subsequent risk of prostate cancer // *Cancer Causes Control.* – 2004. – 15(3). – P. 255–65.
32. *Raimondi S., Johansson H., Maisonneuve P. et al.* Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk // *Carcinogenesis.* – 2009. – 30(7). – P. 1170–80.
33. *Schwartz G.G., Hulka B.S.* Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis) // *Anticancer Res.* – 1990. – 10(5A). – P. 1307–11.
34. *Schwartz G.G., Wang M.H., Zang M. et al.* 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 1997. – 6(9). – P. 727–32.
35. *Schwartz G.G., Whitlatch L.W., Chen T.C. et al.* Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3 // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 1998. – 7(5). – P. 391–5.
36. *Taylor J.A., Hirvonen A., Watson M. et al.* Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism // *Cancer Res.* – 1996. – 56(18). – P. 4108–10.
37. *Travis R.C., Crowe F.L., Allen N.E. et al.* Serum vitamin D and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) // *Am J Epidemiol.* – 2009. – 169(10). – P. 1223–32.
38. *Tuohimaa P., Pukkala E., Scelo G. et al.* Does solar exposure, as indicated by the non-melanoma skin cancers, protect from solid cancers: vitamin D as a possible explanation // *Eur J Cancer.* – 2007. – 43(11). – P. 1701–12.
39. *Wigginton J.E., Cutler D.J., Abecasis G.R.* A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium // *Am J Hum Genet.* – 2005. – 76(5). – P. 887–93.
40. *Xu Y., Shibata A., McNeal J.E. et al.* Vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and prostate cancer progression // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2003. – 12(1). – P. 23–7.

УДК 616.25-002:616-006-085.03

*Д.В. Филоненко, М.Б. Бычков, В.А. Горбунова, Е.М. Трещалина***РЕЗУЛЬТАТЫ I ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ  
БИНАРНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ТЕРАФТАЛ +  
АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЕВЫМИ ПЛЕВРИТАМИ***РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Филоненко Дмитрий Владимирович, аспирант отделения химиотерапии НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-1409**e-mail:** [filonenkodima@mail.ru](mailto:filonenkodima@mail.ru)

Статья поступила: 06.06.2011, принята к печати 25.10.2011

**Резюме**

В исследовании изучена безопасность и эффективность внутриплевральной терапии метастатического ОП с использованием БКС терафтал+аскорбиновая кислота (ТФ+АК). В исследование включено 10 больных с метастатическим ОП. Введение препаратов проводили по модифицированному методу Фибоначчи. Стартовая доза терафтала составила 98 мг/м<sup>2</sup>, аскорбиновой кислоты – 217 мг/м<sup>2</sup>. Дозолимитирующая токсичность – болевой синдром в грудной клетке в первые часы после введения препаратов. Среди других побочных эффектов отмечены: лихорадка (20 %), гипотензия (10 %). Окрашивание мочи в синий цвет, не имеющее клинического значения, отмечено у всех больных. Объективный эффект лечения в виде частичной регрессии зарегистрирован в 80% случаев, у 20% пациентов отмечено прогрессирование ОП. Рекомендованная доза для проведения II фазы исследования системы терафтал + аскорбиновая кислота для внутриплеврального введения составляет 250% от стартовой дозы каждого препарата: для терафтала – 246 мг/м<sup>2</sup>, для аскорбиновой кислоты – 543 мг/м<sup>2</sup>.

**Ключевые слова:** опухолевый плеврит, бинарная каталитическая система, терафтал, безопасность, эффективность.

*D.V. Filonenko, M.B. Bychkov, V.A. Gorbunova, E.M. Treshalina***PHASE I OF CLINICAL STUDY OF BINAR CATALYTIC SYSTEM TERAFTAL +  
ASCORBIC ACID IN PATIENTS  
WITH MALIGNANT PLEURAL EFFUSIONS***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

We studied safety and efficacy of intrapleural therapy of metastatic pleural effusions by a novel method of binar catalytic system teraftal + ascorbic acid. 10 patients with metastatic pleural effusions were enrolled in the study. We used modified Fibonacci method for drug infusion. Starting doses were 98 mg/m<sup>2</sup> for teraftal and 217 mg/m<sup>2</sup> for ascorbic acid. Dose limiting toxicity was chest pain in the first hours after infusion. Other adverse effects were fever (20 %), hypotension (10 %). We observed blue color of urine in all patients, but it was not clinical significant reaction. Objective effect in terms of partial regression was registered in 80% of patients, and 20% of patients had progression of pleural effusion. For phase II of clinical study recommended doses of binar catalytic system teraftal + ascorbic acid are 246 mg/m<sup>2</sup> for teraftal and 543 mg/m<sup>2</sup> for ascorbic acid.

**Key words:** pleural effusion, binar catalytic system, teraftal, safety, efficacy.

**Введение**

Опухолевый плеврит является одним из частых осложнений ряда злокачественных новообразований, в первую очередь, опухолей торакальной локализации. Так, частота развития ОП при раке легкого составляет 20–50 %, молочной железы – до 48 %, при лимфомах и лейкозах – до 26 %, при раке яичников – до 10 %, при раке желудка, толстой кишки, поджелудочной железы, саркоме, меланоме и др. других злокачественных опухолях – у 1–6 % пациентов [1].

ОП обычно свидетельствует о далеко зашедшем опухолевом процессе и является следствием диссеминации опухоли по плевре. При этом использование системной химиотерапии не всегда достаточно эффективно. Улучшение терапевтического эффекта достигается внутриплевральным (регионарным) введением лекарственных средств, что позволяет продлить жизнь больных от 4 мес до 1–3 лет [9; 11; 14].

Современные подходы к внутриплевральной терапии ОП включают использование цитостатических агентов или ПС. Внутриплевральное введение цитостатических агентов реализует эффект путем повышения биодоступности цитостатика за счет прямого взаимодействия с опухолевой клеткой. Применение плевросклерозирующих средств приводит к облитерации плевральной полости за счет слипания (адгезии) и сращения (склерозирования) париетальной и висцеральной плевры, которое получило название «плевродез». Как результат – продукция плеврального выпота прекращается. Для цитотоксической внутриплевральной химиотерапии используются препараты блеомицин, цисплатин, митоксантрон, этопозид, доксорубин и др. Для создания плевродеза применяют препараты с местно-раздражающим действием, например акрихин, далагил, тетрациклин, доксициклин, а также поверхностно активное вещество тальк. Эффективность внутриплевральной химиотерапии варьирует от 30 до 90 %.

Эффективность плевросклерозирующих агентов достигает 100 % (талък, тетрациклин) [6–8; 10; 12; 13; 16; 17]. При этом стоит отметить, что многие противоопухолевые цитостатики, помимо их противоопухолевого действия, обладают также плевросклерозирующим действием на плевру, в связи с чем в основе торможения накопления экссудата лежит не столько противоопухолевый эффект цитостатика, сколько его плевросклерозирующее действие, обуславливающее облитерацию плевральной полости.

Учитывая вышесказанное, поиск новых средств с плевросклерозирующим действием для внутриплевральной терапии ОП является весьма актуальным. Одним из новых подходов для внутриплевральной терапии ОП, основанном на создании искусственного плевродеза, является применение бинарной каталитической системы терафтал + аскорбиновая кислота (ТФ+АК). Компонент системы, отечественный препарат терафтал представляет собой натриевую соль окта-4,5-карбокситаллоцианина кобальта и является катализатором окисления различных биогенных восстановителей, в частности, аскорбиновой кислоты. В основе плевросклерозирующего действия бинарной каталитической терапии лежит способность терафтала катализировать окисление аскорбиновой кислоты (соотношение молярных концентраций ТФ : АК = 1 : 10) в водных растворах при физиологических значениях pH и температуры с образованием активных форм кислорода, а также перекиси водорода [2; 15].

Нами проведено экспериментальное доклиническое изучение противоопухолевой и плевросклерозирующей активности ТФ+АК при внутриплевральном введении на адекватных моделях, позволяющих эффективно отбирать как противоопухолевые вещества, так и плевросклерозирующие агенты терапии ОП [4; 5]. В экспериментах на мышах было показано, что при внутриплевральном введении ТФ+АК вызывает задержку выпота и увеличение продолжительности жизни мышей, одновременно индуцируя эффективный плевродез на уровне тетрациклина вплоть до полной облитерации плевральной полости. Анализ результатов экспериментов показал эффективность каталитической системы, сравнимую с тиотэфом, и индукцию плевродеза на уровне тетрациклина. При изучении основных фармакокинетических параметров терафтала при внутриплевральном введении установлено более медленное всасывание ТФ в кровь в отличие от внутривенного введения, что приводит к повышению концентрации препарата в плевральной полости. Доклиническое изучение безвредности каталитической пары ТФ+АК на двух видах животных, в том числе на собаках, показало хорошую переносимость и подтвердило возможность развития эффективного плевродеза при внутриплевральном введении [3]. Обнаруженная эффективность, а также отсутствие системной токсичности позволили рекомендовать каталитическую систему для клинического изучения у онкологических больных с ОП.

### Материалы и методы

В НИИ КО РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина проведена I фаза клинических испытаний системы терафтал + аскорбиновая кислота при внутриплевральном введении больным с ОП. В исследование включено 10 больных с ОП, которым показано проведение плевросклерозирующей терапии.

*Критерии включения в исследование:*

- возраст не менее 18 лет;
- клинически и морфологически подтвержденный диагноз опухолевого плеврита;

- функциональный статус по Карновскому >70;
- ожидаемая продолжительность жизни >3 мес.;
- сохраненная функция печени и почек;
- отсутствие предшествующей внутриплевральной терапии какими-либо препаратами.

*Первичная цель исследования:* оценка безопасности каталитической системы «ТФ+АК» при внутриплевральном введении пациентам с ОП.

*Вторичная цель исследования:* оценка эффективности каталитической системы «ТФ+АК» при внутриплевральном введении пациентам с ОП.

### Задачи исследования

- отработка доз бинарной каталитической системы ТФ+АК;
- определение максимально переносимой дозы ТФ и дозолимитирующей токсичности при фиксированном сочетании с АК;
- оценка уровня жидкости после введения каталитической системы.

Все больные получали однократное внутриплевральное введение ТФ и АК. До и после введения каталитической системы больные проходили клиническое обследование: оценку общего состояния, клиническое и биохимическое исследование крови; общий анализ мочи; ЭКГ, рентгенографию органов грудной клетки, УЗИ брюшной полости, КТ по показаниям. Распределение больных в зависимости от нозологии представлено в табл. 1.

Таблица 1  
Распределение больных по нозологиям

Заболевание	Число пациентов
Рак молочной железы	5
Рак легкого	2
Рак тела матки	1
Рак желудка	1
Рак без ВПО	1

Лечебный цикл состоял из однократного внутриплеврального введения компонентов каталитической системы с предшествующим и последующим дренированием плевральной полости (последний оставался на 1–3 сут). Местную анестезию осуществляли внутриплевральным введением 30–40 мл 0,5 %-ного р-ра новокаина. Для профилактики гиперчувствительности за 30 мин до инфузии проводили премедикацию дексаметазоном 20 мг в/м.

Терафтал-ЛИО получали из лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО во флаконах по 50 мг. Для введения содержимое флакона растворяли в 0,9%-ном р-ре NaCl до концентрации 0,5% и вводили внутриплевралью струйно. Аскорбиновую кислоту (5- или 10 %-ный раствор) вводили внутриплевралью струйно после окончания введения терафтала. Введение препаратов проводили с учетом рекомендованной токсикологами эскалации разовых доз терафтала по модифицированному методу Фибоначчи. Стартовая доза терафтала составила 98 мг/м<sup>2</sup>, аскорбиновой кислоты – 217 мг/м<sup>2</sup> (табл. 2).

В соответствии с Протоколом исследования о побочных эффектах судили по наличию и степени выраженности болевого синдрома (характерного проявления плевродеза) и другим нежелательным явлениям, в том числе по окраске выделений, кожных покровов и слизистых оболочек после введения терафтала, раствор которого имеет насыщенный синий цвет.

Таблица 2

Эскалация доз ТФ и АК для внутривлепвального введения пациентам с ОП			
% от стартовой дозы	Разовая доза ТФ мг/м <sup>2</sup>	Разовая доза АК мг/м <sup>2</sup>	n больных
100	98	217	1
200	197	434	2
250	246	543	2
350	345	760	2
400	400	880	2
450	444	977	1
520	513	1130	–

Об эффективности лечения судили по стандартным для данной патологии критериям: полная ремиссия, частичная ремиссия и прогрессирование опухолевого плеврита (ПП). Под полной ремиссией понимали полное исчезновение плеврального выпота на срок не менее 1 мес. после введения каталитической системы. Частичная ремиссия – клинически незначимое накопление плеврального выпота или его осумкование, не требующее выполнения торакоцентеза на срок не менее 1 мес. после введения каталитической системы. Прогрессирование – клинически значимое накопление плеврального выпота, требующее выполнения лечебного торакоцентеза.

### Результаты и обсуждение

#### *Безопасность каталитической системы при внутривлепвальном введении*

В ходе исследования установлено: дозолимитирующей токсичностью каталитической системы ТФ+АК является характерный для плевродеза болевой синдром различной интенсивности в области грудной клетки непосредственно после введения препаратов, который отмечался у семи из 10 больных (70%) только при дозах, равных или больше для ТФ – 246 мг/м<sup>2</sup>, для АК – 543 мг/м<sup>2</sup>. Интенсивность боли нарастала при увеличении доз препаратов. Для купирования боли применяли наркотические анальгетики. По болевому синдрому максимально переносимыми дозами препаратов в каталитической системе были для ТФ – 444 мг/м<sup>2</sup> и для АК – 977 мг/м<sup>2</sup>. При этих дозировках болевой синдром был выраженным и плохо купировался наркотическими анальгетиками. В связи с этим дальнейшая эскалация доз не проводилась.

Другие побочные эффекты:

- лихорадка до 37,6 °С при дозах ТФ 345 мг/м<sup>2</sup>, АК – 760 мг/м<sup>2</sup> у 1 больного (10 %);
- лихорадка до 38,5 °С при дозах ТФ – 197 мг/м<sup>2</sup>, АК – 434 мг/м<sup>2</sup> у 1 больного (10 %);
- умеренное снижение АД в течение 1 ч после введения ТФ в дозе 197 мг/м<sup>2</sup>, АК в дозе 434 мг/м<sup>2</sup> у 1 больного (10 %), АД нормализовалось без специальной терапии;
- окрашивание мочи в синий цвет различной интенсивности в течение нескольких дней после введения ТФ у всех больных (100 %).

Других побочных реакций, в том числе окрашивания кожи и видимых слизистых, непосредственно после введения исследуемых препаратов в плевральную полость и в течение всего периода наблюдения не выявлено. Изменений со стороны ЭКГ, гематологических показателей (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма) не отмечали.

#### *Эффективность каталитической системы при внутривлепвальном введении*

У всех больных, включенных в исследование, исходно был диагностирован диссеминированный

опухолевый процесс (IV стадия). Все пациенты до введения терафтал с аскорбиновой кислотой получали различные режимы системной химиотерапии, т.е. у них имелся резистентный к химиотерапии опухолевый плеврит.

В группе из 10 пациентов, получивших внутривлепвальное лечение каталитической системой, у 8 (80 %) пациентов отмечена частичная регрессия опухолевого плеврита (ЧР) в виде рентгенологически подтвержденного осумкования плеврита с уменьшением клинических симптомов дыхательной недостаточности (одышки).

У 2 пациентов (20 %) отмечено прогрессирование плеврита с продолжением накопления жидкости и нарастанием одышки.

После окончания периода наблюдения (1 мес.), если у пациентов отмечалось дальнейшее прогрессирование опухолевого процесса (появление новых метастазов и увеличение в размерах опухолевых очагов), им назначалось специфическое лечение (лучевая терапия или химиотерапия).

### Заключение

В результате I фазы клинических испытаний каталитической системы программа эскалации доз до 450 % от исходной выполнена полностью.

Дальнейшее повышение дозы признано нецелесообразным в связи с нарастанием болевого синдрома. Дозолимитирующая токсичность – болевой синдром в грудной клетке в первые часы после введения препаратов, степень выраженности которого имеет дозозависимый характер.

С целью профилактики болевого синдрома рекомендовано внутримышечное введение промедола 2% 1,0 мл за 15–20 мин до внутривлепвального введения каталитической системы.

Среди других побочных эффектов отмечены: лихорадка (20 %), гипотензия (10 %).

Окрашивание мочи в синий цвет отмечено у всех больных, однако данное побочное явление не имеет клинического значения и не воспринимается пациентами негативно.

У больных, получавших внутривлепвально каталитическую систему терафтал+аскорбиновая кислота в дозах 100–450 % от стартовой, получен объективный эффект лечения в виде частичной регрессии в 80 % случаев, у 20 % пациентов отмечено прогрессирование опухолевого плеврита.

Рекомендованная доза для проведения II фазы исследования системы терафтал + аскорбиновая кислота для внутривлепвального введения составляет 250 % от стартовой дозы каждого препарата: для терафтала – 246 мг/м<sup>2</sup>, для аскорбиновой кислоты – 543 мг/м<sup>2</sup>.

В настоящее время в НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН начато исследование II фазы по изучению эффективности каталитической системы терафтал + аскорбиновая кислота, результаты которого ожидаются в ближайшее время.

## Литература

1. Бычков М.Б. Опухолевые плевриты (дифференциальная диагностика и лечение) // Русский медицинский журнал. – 1999. – Т. 7, № 10. – С. 458–61. – [www.rmj.ru/rmj/t7/n10/3.htm](http://www.rmj.ru/rmj/t7/n10/3.htm).
2. Герасимова Г.К., Жукова О.С., Иванова Т.П. Исследование цитотоксического потенциала каталитической системы, основанной на окислении аскорбиновой кислоты комплексами фталоцианинов с переходными металлами // Вестник Онкологического Научного Центра им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2000. – № 4. – С. 3–8.
3. Михайлова Л.М., Коняева О.И., Членова Е.Л. и др. Доклиническая токсикология терафтала-лио и бинарной каталитической системы «терафтал+ аскорбиновая кислота» // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 695–700.
4. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения: Автореф. дисс. ... д-ра. мед. наук. – М., 2001. – 42 с.
5. Трещалина Е.М., Андропова Н.В. Новые модели, созданные в ОНЦ для целей экспериментальной химиотерапии. – В юбилейном сборнике «Этюды химиотерапии» под ред. В.А Горбуновой. – М., 2000. С. 122–7.
6. DeVries B.C., Bitran J.D. On the management of malignant pleural effusions // Chest. – 1994. – 105. – P. 1–2.
7. Greenwald D.W., Phillips C., Bennett J.M. Management of malignant pleural effusion // J Surg Oncol. – 1978. – 10. – P. 361–8.
8. Lynch T.J. Jr, Kalish L., Mentzer S.J. et al. Optimal therapy of malignant pleural effusions: Report of a randomized trial of bleomycin, tetracycline and talc and a meta-analysis // Int J Oncol. – 1996. – 8. – P. 183–90.
9. Martinez-Moragon E. Pleurodesis in malignant pleural effusions: a randomized study of tetracycline vs bleomycin // Eur. Respir. J. – 1997. – 10(10). – P. 2380–3.
10. Memon A.N., Zawadzki G.A. Pleural effusions // Cur Prob Cancer. – 1981. – 5. – P. 3–30.
11. Papz E.F. Sclerotherapy for malignant pleural effusions: a prospective randomized trial of bleomycin vs doxycyclin with small-bore catheter drainage // Chest. – 1998. – 113(56). – P. 1305–11.
12. Piver S.M., Lele S.B., Marchetti D.L. et al. Surgically documented response to intraperitoneal cisplatin, cytarabine, and bleomycin after intravenous cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian adenocarcinoma // J Clin Oncol. – 1988. – 6. – P. 1679–84.
13. Ruckdeschel J.C. Management of malignant pleural effusion: An overview // Semin Oncol. – 1988. – 15. – P. 24–8.
14. Satrori S. Intracavitary bleomycin vs interferon in the management of malignant pleural effusion // Chest. – 1998. – 113(4). – P. 1145–6.
15. Volpin M.E., Vorozhtsov G.N., Gerasimova G.K. et al. Patent “Agent for suppressing tumor growth”.-PCI Int. Appl. WO 97 03, 666, (Cl. A61K31/40).-6 Feb.-1997.-RU.-Appl.-95.112.240.-17 Jul.-1995/-p.16 (Russ).
16. Walker-Renard P.B., Vaughan L.M., Sahn S.A. Chemical pleurodesis for malignant pleural effusions // Ann Intern Med. – 1994. – 120. – P. 56–64.
17. Yim A.P., Chung S.S., Lee T.W. et al. Thoracoscopic management of malignant pleural effusions // Chest. – 1996. – 109. – P. 1234–8.

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



УДК 616.155.392.11:577.115:615.2/.3

*Л.Б. Хворостенко<sup>1</sup>, М.Н. Делиханова<sup>2</sup>, В.А. Платицын<sup>2</sup>, О.И. Фролова<sup>2</sup>***ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ И ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ**<sup>1</sup>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Тюменской области «Областная клиническая больница №1», Тюмень<sup>2</sup>ГОУ ВПО Тюменская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития, Центральная научно-исследовательская лаборатория, Тюмень**Контактная информация:***Хворостенко Лев Борисович, врач-гематолог ГБУ ОКБ №1***адрес:** 625023, г. Тюмень, ул. Котовского, 55; **тел.** +7(3452)28-7718**e-mail:** [lione-83@mail.ru](mailto:lione-83@mail.ru)

Статья поступила: 06.08.2011, принята к печати: 25.10.2011.

**Резюме**

В работе изучены элементы антиоксидантной защиты организма у пациентов с впервые выявленным острым лейкозом. Оценивается влияние исходного уровня биохимических показателей липидных ретинола,  $\alpha$ -токоферола, церулоплазмينا, активности глутатион-S-трансферазы на результаты химиотерапии.

**Ключевые слова:** острый лейкоз, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, ретинол,  $\alpha$ -токоферол, церулоплазмин, глутатион-S-трансфераза.

*L.B. Khvorostenko<sup>1</sup>, M.N. Delikhanova<sup>2</sup>, V.A. Platitsyn<sup>2</sup>, O.I. Frolova<sup>2</sup>***FEATURES ANTIOXIDANTS PROFILE OF SERUM AND ERYTHROCYTES AT ACUTE LEUKEMIA**<sup>1</sup>Clinical Hospital №1, Tumen<sup>2</sup>State Medical Academy, Tumen**Abstract**

This paper studies elements of antioxidant defense in patients with newly diagnosed acute leukemia. The influence the initial level biochemical values: retinol,  $\alpha$ -tocopherol, ceruloplasmin, activity of glutathione-S-transferase on the results of chemotherapy.

**Key words:** acute leukemia, lipid peroxidation, antioxidant protection, retinol,  $\alpha$ -tocopherol, ceruloplasmin, glutathione-S-transferase.

**Введение**

В связи с ростом онкологических заболеваний, проблема их лечения становится наиболее актуальной. Основным методом лечения онкогематологических заболеваний, в частности ОЛ, является интенсивная полихимиотерапия. Однако, несмотря на высокий процент ремиссий после начальной терапии, часто бывает рецидив заболевания [8; 13; 15].

В последнее время появилось множество исследовательских работ, доказывающих мембранотоксическую активность опухолевых клеток, которая реализуется путем способности опухолевого субстрата «генерировать» активные формы кислорода, оказывающие цитотоксическое действие на окружающие ткани и проходящие через них клетки крови [6], а также подтверждающих активацию свободно-радикального окисления липидов при ОЛ [7; 16]. Основной точкой приложения нерегулируемой активации свободно-радикального окисления липидов являются фосфолипиды клеточных мембран [11].

Основными механизмами в метаболизме и распределении ксенобиотиков являются функционирование ферментов первой и второй фазы их биотрансформации. Фермент второй фазы глутатион-S-трансфераза класса Р участвует в процессах детоксикации широкого спектра электрофильных соединений, включая мутагены и канцерогены окружающей среды [14; 15]. Многие цитостатики, применяемые для лечения

острых лейкозов, такие как алкилирующие агенты, антрациклины, стероидные гормоны также являются субстратами глутатион-S-трансфераз [9; 10]. Накопление свободных радикалов в высоких концентрациях приводит к повреждению мембран, окислению мембранных структур жизненно важных органов – печени, сердца, почек – в конечном итоге может развиваться полиорганный недостаток, ведущая к гибели пациента. Но природа предусмотрела защиту от свободно-радикального окисления, включающую неферментативные механизмы (витамины-антиоксиданты и др.) и ферментативные (внутриклеточные ферменты, например супероксиддисмутазы, и внеклеточные, к которым относится церулоплазмин [1; 2]).

**Цель исследования.** Изучить особенности антиоксидантного профиля сыворотки и эритроцитов на различных этапах химиотерапии ОЛ.

**Материалы и методы**

Протокол исследования включает проспективное (5 лет) с 2006 по 2011 гг. наблюдение 75 больных с момента верификации диагноза ОЛ и на дальнейших этапах терапии.

Комплексное обследование и проспективное наблюдение пациентов проводилось на базе гематологического отделения Тюменской областной клинической больницы. Возраст пациентов 18÷77 лет (ср. 44,3 лет). Мужчин было 41 (54,67 %), женщин – 34 (45,33 %).

Лабораторное исследование включало в себя:

- экстракцию липидов из крови (методом Фолча–Блура),
- определение диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот (метод И.Д. Стальной, 1977),
- определение содержания шиффовых оснований (флуориметрический метод W.R. Bidlack, 1959),
- определение активности глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) в эритроцитах (А.И. Карпищенко и др., 2002 г.),
- одновременное флуориметрическое определение витаминов А и Е в сыворотке/плазме крови (Р.Ч. Черняускене и др., 1984),
- определение церулоплазмينا в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом (реактивы фирмы «SENTINEL», Италия).

### Результаты и обсуждение

При исследовании фракционного состава липидного бислоя мембран эритроцитов больных ОЛ нами обнаружены выраженные изменения липидной архитектоники мембран. Как следует из представленных на рис. 1 данных, при манифестации ОЛ наблюдается резкое снижение пула общих фосфолипидов мембран эритроцитов больных ( $p < 0,05$ ). При достижении первичной ремиссии заболевания, во время проведения индукционной, консолидационной терапии, развитии рецидива и противорецидивной терапии сохраняется дефицит общих фосфолипидов (ФЛ).

Отмечается достоверное снижение концентрации общего холестерина (ХС) мембран эритроцитов больных ОЛ во время консолидационной терапии, а также увеличение концентрации общего ХС мембран эритроцитов пациентов с ОЛ во время рецидива заболевания и противорецидивной терапии.

Полученные данные в период рецидива заболевания и противорецидивной терапии свидетельствуют о снижении механизмов эстерификации ХС, направленных в норме на выведение из мембранных структур избытков ХС и сохранение агрегатных свойств липидного бислоя клеточных мембран в связи с дефицитом мембранных фосфолипидов [3].

Увеличение концентрации ХС в липидном бислое клеточных мембран можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на поддержание стабильности липидного матрикса в условиях дефицита фосфолипидов [11].

Однако обогащение мембран эритроцитов ХС ведет к значительному возрастанию ригидности клеточных мембран, ухудшая основные параметры клеток, в частности кислородно-транспортную функцию красных клеток крови, их деформируемость, а, следовательно, и реологические свойства крови, а также функциональную активность иммунокомпетентных клеток.

Данный факт демонстрирует компенсаторное увеличение концентрации ХС в липидном бислое мембран эритроцитов, направленное на поддержание стабильности липидного матрикса в условиях глубокого дефицита мембранных фосфолипидов.

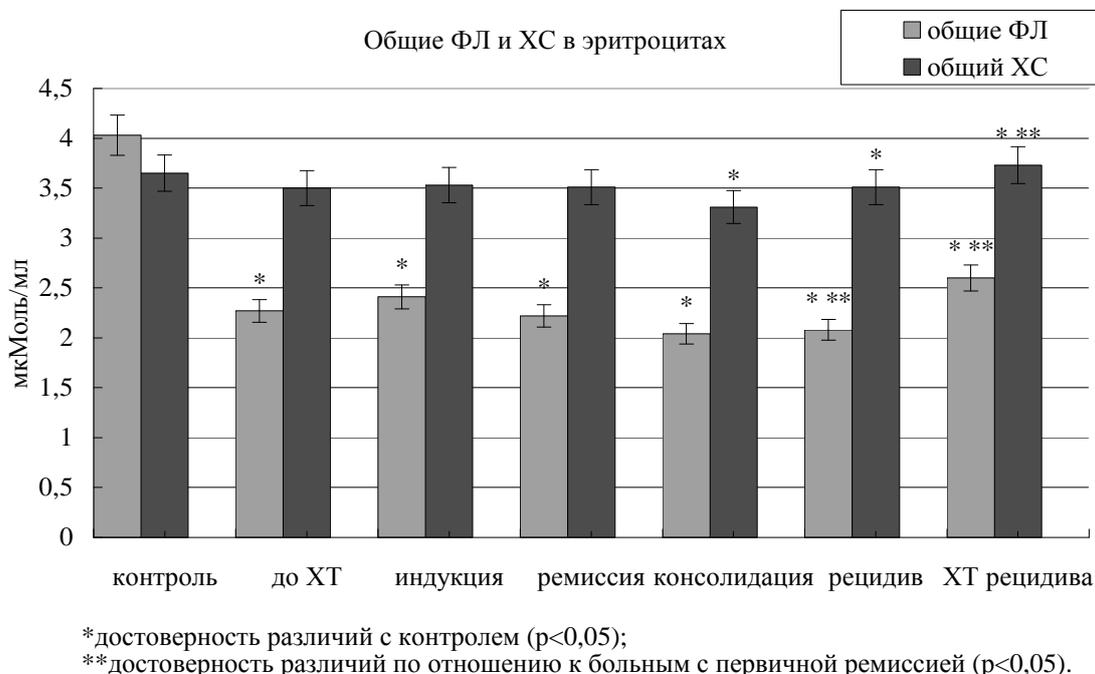


Рис. 1. Липидный спектр мембран эритроцитов ОЛ в различные периоды заболевания.

Таким образом, у пациентов с ОЛ во все периоды заболевания регистрируются мембрано-деструктивные изменения эритроцита, более выраженные в периоды рецидивов и противорецидивной терапии. Определение активности процессов перекисидации липидов, антиоксидантной системы и структурных параметров клеточных мембран проведено также на модели эритроцитов [4]. Как следует из приведенных на рис. 2 данных, в мембранах эритроцитов больных ОЛ в период верификации диагноза отмечается высокий, значительно превышающий показатели здоровых лиц ( $p < 0,05$ ), уровень концентрации первичных продуктов ПОЛ – ДК, обладающих наибольшими высокотоксичными свойствами в плане повреждения внутриклеточных органелл, мембранных липопротеидов, белков, ферментов трансмембранного транспорта [5; 12]. В период достижения первичной ремиссии ОЛ во время индукционной, консолидационной терапии, рецидиве заболевания и противорецидивной терапии отмечается сохранение достоверно высоких показателей токсичных диеновых конъюгат ( $p < 0,05$ ). Также достоверно увеличивается элиминация почками диеновых конъюгат ( $p < 0,05$ ) с постепенным снижением этой способности. Уровень конечных продуктов липопероксидации липидов – ШО у больных ОЛ во все периоды заболевания достоверно выше показателей контрольной группы ( $p < 0,05$ ), что видно на рис. 3. Образования Шиффа – конечные продукты перекисидации липидов занимают особое место в процессах ПОЛ. С одной стороны, непрерывное накопление в мембранных структурах ШО, представляющих собой необратимые «сшивки» диальдегидов со свободными аминокеттогруппами мембранных белков, характеризует стадию дегенеративных изменений клеток. С другой, высокий уровень ШО можно рассматривать как адаптивный процесс, направленный на элиминацию из клеток более токсичных метаболитов ПОЛ – ДК и МДА [4]. В период консолидационной терапии ОЛ отмечается увеличение деструктивных процессов мембран эритроцитов, подтверждаемое достоверно высоким уровнем ШО, который достоверно выше показателей группы с первичной ремиссией ( $p < 0,05$ ). Во время проведения противорецидивной терапии деструктивные процессы наиболее выражены.

Элиминация с мочой конечных продуктов перекисидации липидов – оснований Шиффа – у больных ОЛ во все периоды достоверно выше аналогичных показателей контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

В период консолидационной терапии, рецидива заболевания ОЛ отмечается увеличение элиминации конечных продуктов перекисидации липидов мембран эритроцитов, подтверждаемое высоким уровнем ШО в моче, который достоверно выше показателей группы с первичной ремиссией ( $p < 0,05$ ) с незначительным снижением в период терапии рецидива заболевания.

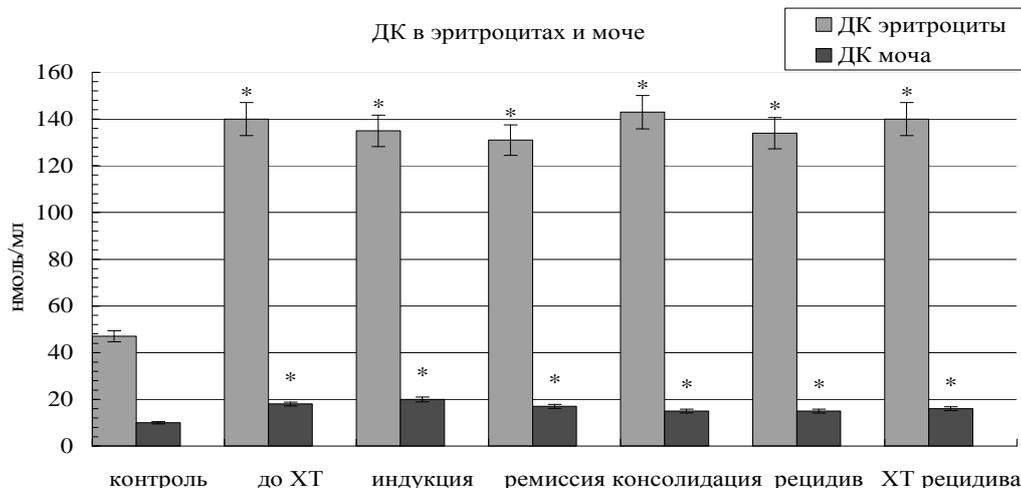
Полученные данные свидетельствуют, что у больных ОЛ наблюдается увеличение активности процессов липопероксидации мембранных липидов с наибольшей выраженностью в период рецидива ОЛ.

В сыворотке крови больных ОЛ обнаружено статистически значимое снижение уровня антиоксидантов ретинола и  $\alpha$ -ТФ по сравнению с показателями контрольной ( $p < 0,05$ ) группы (рис. 4).

Снижение уровня антиоксидантов было во все периоды течения ОЛ. Выявлена достоверная недостаточность уровня ферментативной АОЗ в сыворотке крови больных ОЛ в различные периоды заболевания за счет статистически достоверного снижения уровня церулоплазмينا по сравнению ( $p < 0,05$ ) с показателями контрольной группы (рис. 5). Наибольшее снижение концентрации церулоплазмينا в сыворотке наблюдалось у пациентов в период рецидива заболевания, которое достоверно ниже по отношению к пациентам с первичной ремиссией ( $p < 0,05$ ).

В тоже время отмечается напряженность работы ферментативной АОЗ за счет статистически достоверного увеличения уровня активности Г-S-T по сравнению с показателями контрольной группы ( $p < 0,05$ ), которая достигает пика активности в период индукционной терапии.

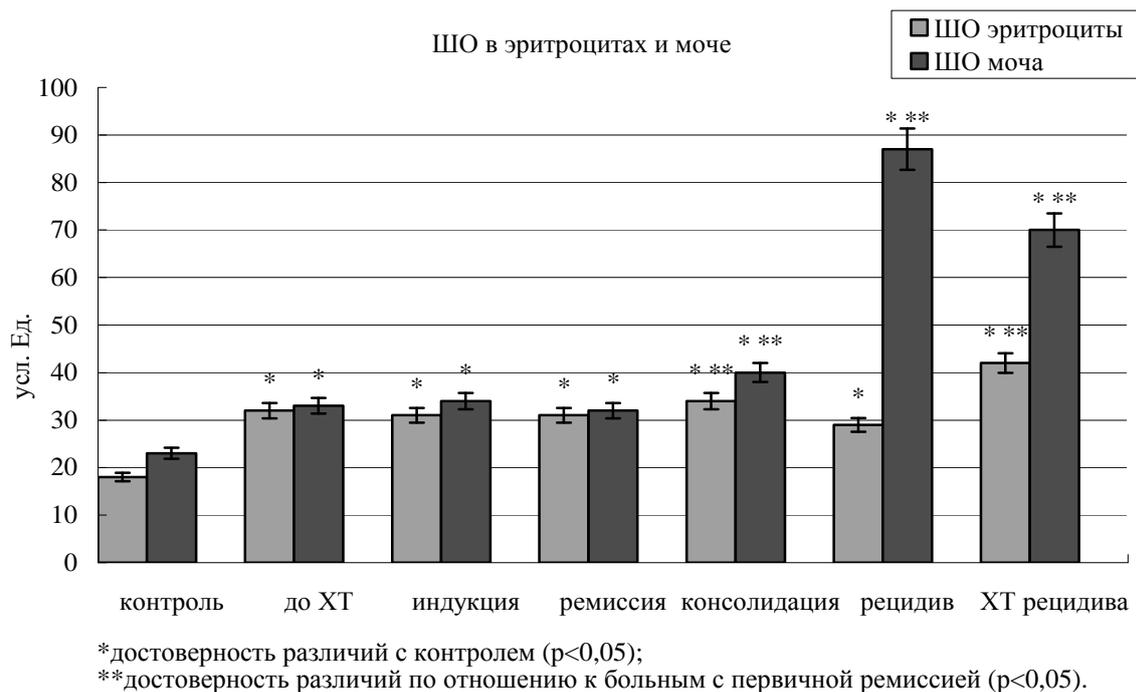
Статистически достоверные изменения уровня активности Г-S-T ( $p < 0,05$ ) у больных с первичной ремиссией наблюдались в группах пациентов в период верификации диагноза и консолидационной терапии.



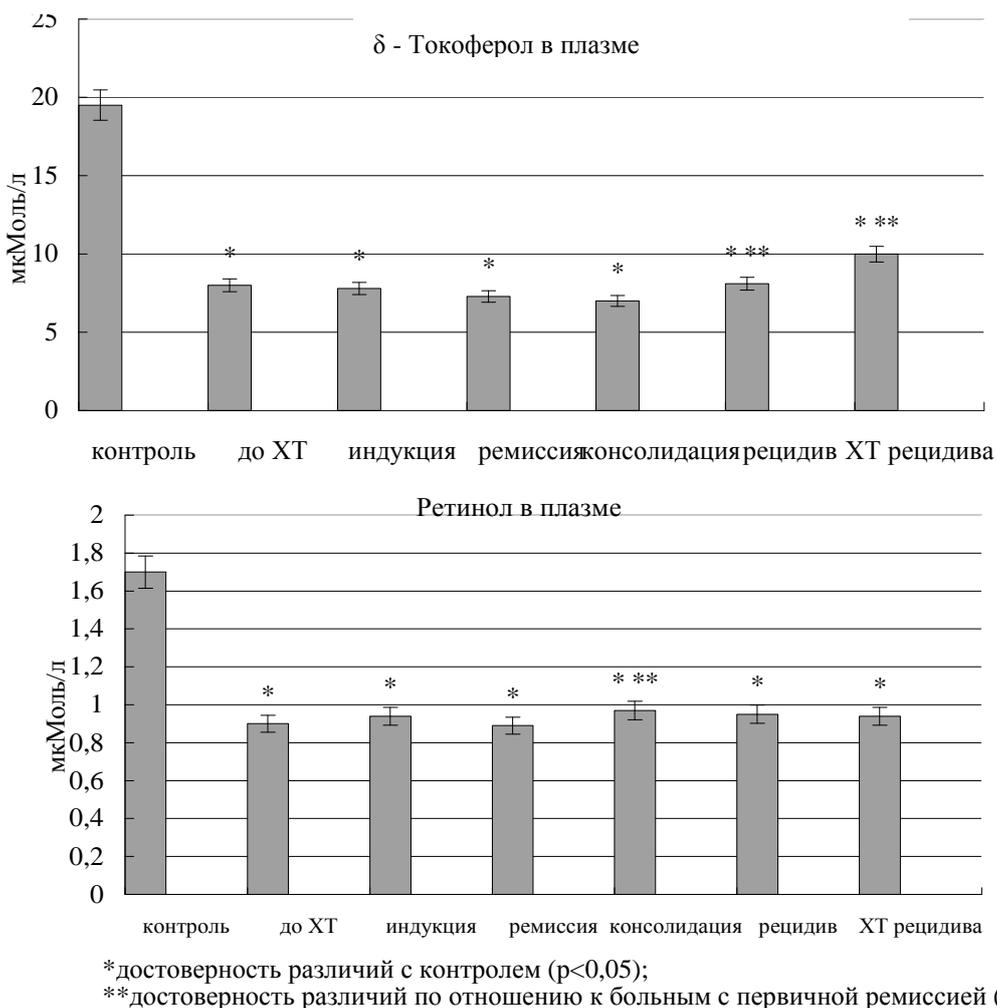
\* достоверность различий с контролем ( $p < 0,05$ );

\*\* достоверность различий по отношению к больным с первичной ремиссией ( $p < 0,05$ ).

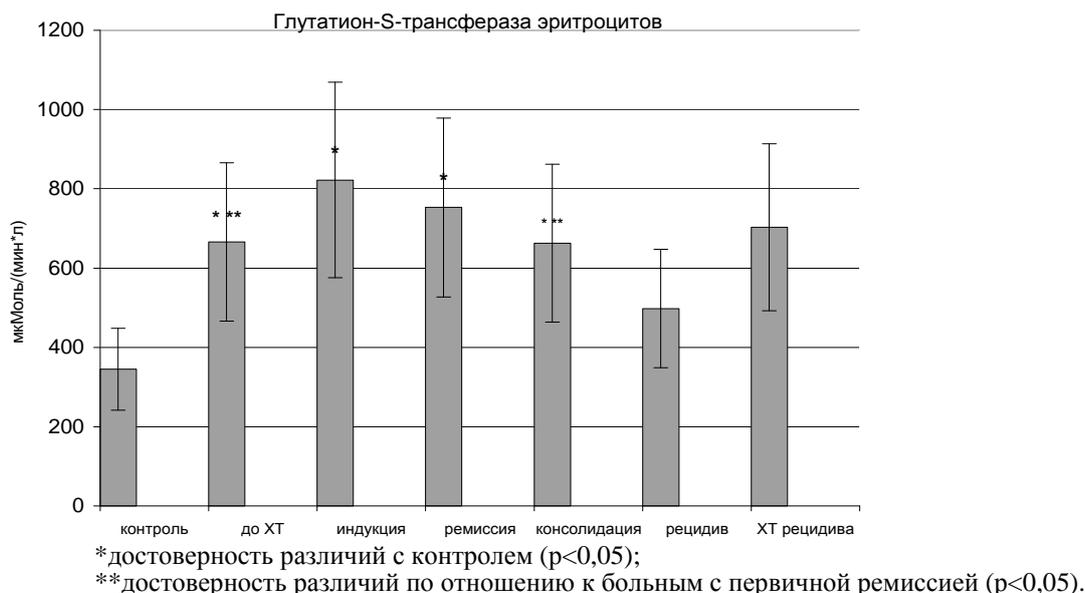
**Рис. 2.** Содержание начальных продуктов перекисидации липидов в мембранах эритроцитов и моче больных ОЛ в различные периоды заболевания.



**Рис. 3.** Содержание конечных продуктов пероксидации липидов в мембранах эритроцитов и моче больных ОЛ в различные периоды заболевания.



**Рис. 4.** Содержание жирорастворимых витаминов-антиоксидантов в сыворотке крови больных ОЛ в различные периоды заболевания.



**Рис. 5.** Ферментативный антиоксидантный профиль сыворотки крови и эритроцитов у больных ОЛ в различные периоды заболевания.

### Заключение

В разные периоды течения ОЛ можно констатировать наличие глубоких изменений липидной архитектоники мембран эритроцитов, проявляющихся дефицитом общих фосфолипидов в условиях нерегулируемой интенсификации процессов перекисидации липидов. У больных наблюдается достоверно избыточное накопление первичных продуктов липопероксидации мембранных липидов – дис-

новых конъюгат – на всех этапах с наибольшей выраженностью в период консолидационной терапии ОЛ и постепенным снижением компенсаторных механизмов элиминации. При развитии рецидива заболевания наблюдается наиболее выраженное снижение активности ферментативного антиоксидантного профиля сыворотки и эритроцитов на фоне сохраняющегося глубокого некомпенсированного дефицита ферментативного звена антиоксидантной защиты.

### Литература

1. Бердинских Н.К., Курищук К.В., Лянюшко Н.М. и др. Церулоплазмин: вид биотехнологии до клинического применения. – К., 2006. – 175 с.
2. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. – М.: Медицина, 2001. – 571 с.
3. Грацианский Н.А. Холестерин и здоровье. – Тюмень, 1995. – 68 с.
4. Жмуров В.А., Крылов В.И., Кашуба Э.А., Чимаров В.М. Нephропатии (аспекты мембранологии). – Тюмень, 1993. – 360 с.
5. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Шергин С.И. Окислительный стресс // Диагностика, терапия, профилактика. РАМН, Сиб. отд., Новосибирск, 1993. – 181 с.
6. Киселев Ф.Л., Павлиш О.А., Татосян О.Г. Молекулярные основы канцерогенеза у человека. – М., 1990. – 316 с.
7. Лосева М.И., Поспелова Т.И. Печень при гемобластозах: научное издание. – Новосибирск: НМИ, 1999. – 414 с.
8. Поддубная И.В., Хасанов Р.Ш., Ручкин В.Н. Открытое несравнительное исследование гикамтина в качестве терапии 2 линии при раке яичников. Лечение рецидивов рака яичников гикамтином - опыт российских регионов (предварительная оценка непосредственных результатов) // Современная Онкология. – 2001. – Т. 3, № 1. – С. 36–8.
9. Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Биохимия. – 2000. – Т. 65, Вып. 1. – С. 112–26.
10. Ставровская А.А. Резистентность больных гемобластозами к лекарственной терапии: молекулярные механизмы и проблемы преодоления множественной лекарственной устойчивости. В кн.: Клиническая онкогематология, издание второе. М.А. Волкова (ред.). – М.: Медицина, 2007. – С. 246–56.
11. Сторожок Н.М. О роли и механизме действия фосфолипидов в процессе окисления природных систем, содержащих антиоксиданты // Вопросы питания. – 1996. – 2. – С. 25–8.
12. Beartling C.J. Role of hydrogen peroxide in the cytotoxic effects of UV-A/B radiation on mammalian cell // Photochem. Photobiol. – 1996. – 64 (1). – P. 137–42.
13. Robak Tadeusz. Second malignancies and Richter's syndrome in patients with chronic lymphocytic leukemia // Hematology. – 2004. – 9(5–6). – P. 387–400.
14. Salinas A.E., Wong M.G. Glutathione S-transferases-a review//Curr. Med. Chem. – 1999. – 6. – P. 279–309.
15. Thomas I.T., Coley H.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein // Cancer Control. – 2003. – 10. – P. 159–65.
16. Wagner B.A., Buettner G.R., Burns C.P. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells // Arch Biochem Biophys. – 1996. – 334(2). – P. 261–7.

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



## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006-085.277.3:615.016.44

*Д.Ю. Блохин, Е.Ф. Чмутин, П.К. Иванов***МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ:  
ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДУЛЯТОРЫ***РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Блохин Дмитрий Юрьевич, д-р медицинских наук, заведующий лабораторией фармакоцитокинетики НИИ ЭДТО***Адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., д. 24; **тел.** +7(495)324-22-64; **факс** +7(495)323-53-33**E-mail:** [blokhin@yandex.ru](mailto:blokhin@yandex.ru)

Статья поступила: 25.11.2010, принята к печати

**Резюме**

Обзор дает общее представление о новых молекулярных мишенях для противоопухолевой терапии, включая компоненты внутриклеточных путей передачи сигналов и факторы, регулирующие экспрессию генов и их белковых продуктов. В частности рассматриваются сигнальные пути Ras/Raf/MEK/Erk/MAPK и PI3K/Akt/mTOR, киназы Bcr/Abl и Src, гистоновая деацетилаза, ДНК-метилтрансфераза и PARP, белок теплового шока HSP90, система убиквитин-протеасома, а также митотические белки/ферменты. Приводятся воздействующие на эти факторы препараты, разрешенные к применению или находящиеся на разных стадиях клинических испытаний.

**Ключевые слова:** пути передачи сигнала, эпигенетические модуляторы, противоопухолевая терапия.*D.Yu. Blokhin, E.F. Chmutin, P.K. Ivanov***MOLECULAR TARGETS FOR ANTICANCER THERAPY:  
SIGNALING PATHWAYS AND EPIGENETIC MODULATORS***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Centre of RAMS, Moscow***Abstract**

The review provides a general outlook of the new promising molecular targets for anticancer therapy including the components of signaling pathways and transcription/translation modifiers. Particularly, the following factors are discussed: Ras/Raf/MEK/Erk/MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways, kinases Bcr/Abl and Src, histone deacetylase, DNA methyltransferase, PARP, heat shock protein HSP90, ubiquitin-proteasome system, and mitotic proteins/enzymes. A brief description of agents targeting these factors is given with particular emphasis on those approved for clinical use or undergoing at different stages of clinical trials.

**Key words:** signaling pathways, epigenetic modulators, anticancer therapy.**Введение**

Большинство классических противоопухолевых лекарственных средств, разработанных во второй половине прошедшего века и составляющих базу для современной ХТ, действуют путем нарушения процесса репликации ДНК, затруднения восстановления повреждений ДНК или блокады митоза опухолевых клеток. Однако с середины 1990-х гг., по мере накопления знаний о механизмах возникновения и развития опухолей, в дополнение к уже используемым химиотерапевтическим препаратам бурно разрабатывается новое поколение противоопухолевых средств, получивших наименование «таргетных» (от англ. *target* – мишень). Такое наименование говорит о молекулярной нацеленности подобных лекарств, что, на наш взгляд, некорректно умаляет такую же нацеленность ряда средств «классической» ХТ: антимиетаболитов (фторпиримидинов, метотрексата), алкалоидов Винка, таксанов, элиподофиллотоксинов, антагонистов гормонов тамоксифена и гозерелина, имеющих вполне определенные молекулярные мишени. Однако термин прочно укрепился и широко используется для обозначения химических и биотехнологических веществ, прицельно воздействующих на компоненты путей передачи внутриклеточных сигналов, что в итоге приводит к их

цитостатическому и циторедуктивному эффектам в отношении клеток опухоли. Примечательно, что первый лекарственный препарат **иматиниб** (*Гливек*<sup>1</sup>), с появлением которого связывают наступление новой, «таргетной» эры в лекарственном лечении опухолевых заболеваний, разрабатывался под названием *STI-571* (Signal Transduction Inhibitor). Клинический успех первых «таргетных» лекарственных средств свидетельствовал о правильно выбранном направлении в развитии ХТ и способствовал массовому созданию новых лекарств с молекулярной направленностью действия. Сегодня на мировой фармацевтический рынок выведены полтора десятка противоопухолевых препаратов нового поколения, а еще несколько десятков подобных веществ проходят различные стадии доклинического и клинического изучения. В настоящем обзоре представлена информация о некоторых перспективных молекулярных мишенях для противоопухолевой терапии – компонентах внутриклеточных путей передачи сигналов и факторов, регулирующих экспрессию генов и их белковых продуктов.

<sup>1</sup>Здесь и далее по тексту: международное непатентованное наименование препарата выделено **полужирным шрифтом**, в скобках приведено торговое название (или шифр при испытаниях - *выделено полужирным курсивом*).

Рассматриваются митогенные сигнальные пути PI3K/Akt/mTOR и Ras/Raf/MEK/Erk/MAPK, гистоновая деацетилаза (ГДА), ДНК-метилтрансфераза (ДМТ) и PARP, белок теплового шока HSP90, система убиквитин-протеасома, а также митотические белки/ферменты. Кратко описываются воздействующие на эти факторы противоопухолевые препараты, разрешенные к применению или находящиеся на поздних фазах клинических испытаний. Список таких препаратов суммирован в таблице.

#### **Внутриклеточные пути передачи сигналов**

Многие биологически активные вещества, включая гормоны, цитокины, нейромедиаторы, молекулы адгезии и межклеточного взаимодействия, влияющие на метаболизм, рост, подвижность, пролиферацию и дифференцировку клеток, следует рассматривать как первичные химические сигналы, которые взаимодействуют с поверхностными рецепторами клеток, вызывая активацию последних. Вторичный сигнал формируется активированным рецептором и передается на эффекторные структуры внутри клетки по каскадной цепочке реакций, включающей последовательную активацию различных промежуточных компонентов. Эти цепочки реакций в совокупности составляют пути передачи сигналов. Существует несколько магистральных сигнальных путей, которые взаимодействуют друг с другом через общие компоненты по принципу положительных и отрицательных обратных связей. Сигналы от разных рецепторов могут передаваться по разным путям, но могут использовать общие компоненты; сигналы от одного рецептора могут вариантно передаваться по разным сигнальным путям, вызывая разные по характеру (часто – противоположные) эффекты. Одни сигналы могут усиливать другие и ослаблять (и даже блокировать) третьи. Поскольку живая клетка постоянно получает значительное количество разнонаправленных внешних первичных сигналов, каждый из них в отдельности не подлежит немедленному исполнению: результирующий эффект зависит от совокупности, последовательности, силы и длительности всех сигналов, что часто именуют «клеточным контекстом». Уместна аналогия с музыкой, в которой совокупность звуков (сигналов), их сила, последовательность и долгота звучания складываются в мелодию. Пауза (отсутствие сигнала) тоже рассматривается как сигнал. Так, дефицит ростовых факторов снижает скорость фосфорилирования рецепторными тирозинкиназами цитозольного белка Bad (из семейства Вах-подобных активаторов апоптоза), что приводит к его спонтанному дефосфорилированию с приобретением апоптогенной активности – запускается митохондриальный путь индукции апоптоза.

Таким образом, множество сигнальных путей формирует сеть, в которой магистральные пути сообщаются через многочисленные разветвления, отблужения, перекрестки и коллатерали. Для практической онкологии наибольший интерес представляют магистральные пути передачи сигнала PI3K/Akt/mTOR и Ras/Raf/MEK/Erk/MAPK.

#### **PI3K/Akt/mTOR**

Путь передачи сигнала через фосфоинозитид-3-киназу (PI3K), киназу Akt и мишень рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR - mammalian target of rapamycin) проводит сигналы различных факторов роста и рецепторных киназ, регулируя многие аспекты роста и метаболизма клеток.

Хотя этот путь обычно описывается в виде линейной цепочки, он подвергается сложной регуляции, включающей внутренние механизмы обратной связи, и “горизонтально” связан с другими путями передачи сигналов, в том числе через митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК).

PI3K – это мембраносвязанная киназа, которая при активации рецепторными киназами фосфорилирует фосфоинозитол до 3-фосфоинозида, который, в свою очередь, трансактивирует ряд ферментов, в том числе протеинкиназу В (PKB, иначе называемую Akt). Активация Akt происходит опосредованно через фосфорилирование промежуточных протеинкиназ (например, PDK-1), субстратами которых являются «нижестоящие» протеинкиназы (Akt, PKC), в связи с чем эти промежуточные белки именуют киназами киназ. Активированный Akt тормозит функции белкового комплекса TSC-2, который в норме подавляет вызываемую mTOR активацию регуляторов процессов транскрипции и трансляции p70<sup>s6k</sup> и 4EBP1.

Направленное воздействие на путь передачи сигнала PI3K/Akt/mTOR представляется перспективной стратегией противоопухолевой терапии, поскольку участвующие в этом пути киназы постоянно активированы при нескольких типах рака, и эта активация сопряжена с негативным прогнозом течения и резистентностью опухолей к химиотерапии [13]. В числе прочего, активация пути PI3K/Akt/mTOR приводит к стимуляции экспрессии индуцируемого гипоксией фактора 1α (HIF-1α), который является важным регулятором ангиогенеза. Экспрессия HIF-1α усилена в характерных для опухолей условиях гипоксии и приводит к стимуляции секреции опухолевыми клетками эндотелиального фактора роста сосудов VEGF и тромбоцитарного фактора роста PDGF. Основные усилия исследователей направлены на разработку низкомолекулярных ингибиторов PI3K, Akt и mTOR. Активная работа в этой области привела к тому, что первые препараты группы уже разрешены к применению.

Наибольшие успехи достигнуты в создании ингибиторов mTOR благодаря длительной истории изучения этого фактора. mTOR – цитозольная серин/треониновая киназа, которая обнаружена в 1990-е гг. при изучении макролидного антибиотика **рапамицина (Сиролимуса)** [27]. Рапамицин является иммуносупрессором и применяется для предотвращения отторжения трансплантатов, а в рамках I/II фаз клинических испытаний изучалась возможность его применения при некоторых формах солидных опухолей, в частности, при раке поджелудочной железы [17]. Более успешным оказался водорастворимый эфир Сиролимуса **темсиролимус (Торисел)**, который, по сравнению с интерфероном, увеличивает медиану общего срока выживания и выживаемость без прогрессирования ранее не леченных больных с поздними стадиями рака почки, имеющих негативный прогноз [16]. Основываясь на этих данных, препарат был разрешен для применения у данной категории больных [28]. В настоящее время также проводятся исследования применения темсиролимуса в режиме монотерапии или в комбинации с цитостатиками для лечения меланомы, множественной миеломы и опухолей репродуктивных органов [51].

Другой пероральный ингибитор mTOR **эверолимус (Афинитор, Certican)** разрешен для лечения метастатического рака почки у больных, имевших прогрессирование на фоне лечения **сунитинибом** и/или **сорафенибом**.

Таблица

Противоопухолевые препараты, разрешенные для клинического применения или проходящие поздние стадии клинических испытаний

Препарат	Мишень	Показания к применению
Разрешены к применению:		
Цетуксимаб ( <i>Эрбитукс</i> )	EGFR1	КРР (без мутации <i>K-RAS</i> ), рак органов головы и шеи
Панипумумаб ( <i>Вектибикс</i> )	EGFR1	КРР (без мутации <i>K-RAS</i> )
Сорафениб ( <i>Нексавар</i> )	VEGFR/PDGFR/Raf	Рак почки, рак печени
Темсиролимус ( <i>Торизел</i> )	mTOR	Рак почки
Эверолимус ( <i>Афгинитор</i> )		
Иматиниб ( <i>Гливек</i> )	Bcr/Abl, c-Kit	Ph <sup>+</sup> -ОЛЛ, Ph <sup>+</sup> -ХМЛ (без мутации T315I), GIST, дерматофибросаркома, системный мастоцитоз (без мутации D816V)
Нилотиниб ( <i>Тасигна</i> )	Bcr/Abl	Ph <sup>+</sup> -ОЛЛ, Ph <sup>+</sup> -ХМЛ
Дазатиниб ( <i>Спрайсел</i> )	Bcr/Abl, Src	Ph <sup>+</sup> -ОЛЛ, Ph <sup>+</sup> -ХМЛ
Вориностат ( <i>Zolinza</i> )	ГДА	Кожная Т-клеточная лимфома
5-азацитидин ( <i>Вайдаза</i> )	ДМТ	МДС
Децитабин ( <i>Дакоген</i> )		
Бортезомиб ( <i>Велкейд</i> )		
III фаза испытаний:		
Перифосин ( <i>NSC 639966, KRX-0401</i> )	Akt	КРР
Типифарниб ( <i>Zarnestra</i> )	ФТ	Лейкозы
Вориностат ( <i>Zolinza</i> )	ГДА	НМРЛ, мезотелиома
<i>CI-994</i>	ГДА	НМРЛ
Танеспимицин ( <i>KOS-953</i> )	HSP90	РМЖ, ММ
Серым фоном обозначены препараты терапевтических МКА, белым – низкомолекулярные ингибиторы ферментов.		

Препарат увеличивает срок выживания без прогрессирования более чем в 2 раза [31]. Кроме того, в рамках II фазы изучается возможность применения препарата при других типах солидных опухолей и гемобластозов [51]. II фазу клинических испытаний прошел ингибитор mTOR **дефоролимус (AP-23,573)**, применявшийся для лечения рецидивирующих или резистентных гемобластозов [39].

Akt, также называемая протеинкиназой В, это серин/треониновая киназа, участвующая в регуляции прохождения клеточного цикла, процессов трансляции, транскрипции, метаболизма и апоптоза.

Благодаря разнообразным клеточным функциям, киназа Akt вовлечена в процессы развития и прогрессирования опухолей [35] и является столь же, если не более, привлекательной мишенью для терапевтического воздействия, как и mTOR.

Однако до настоящего времени попытки создания терапевтических ингибиторов Akt давали противоречивые результаты. Наиболее продвинутый неселективный липидный ингибитор Akt **перифосин (NSC 639966, KRX-0401)**, который изменяет структуру клеточной мембраны и блокирует транслокацию в нее Akt, в доклинических исследованиях проявлял многообещающую активность в отношении нескольких линий опухолевых клеток человека [23]. Но в клинических исследованиях по I фазе монотерапия **перифосином** вызвала серьезные побочные эффекты и была в целом малоэффективна [49].

Тем не менее, продолжается II фаза его клинических испытаний для лечения рекуррентной мультиформной глиобластомы, и проходит III фаза в комбинации с капецитабином для лечения распространенного КРР [11].

Известным ингибитором PDK-1 (фермента активации киназы Akt) является индолокарбазол **стауропорин** [35]. Его 7-гидроксипроизводное **UCN-01** в настоящее время проходит II фазу клинических испытаний для лечения гемобластозов [44]. Однако **UCN-01** является неселективным ингибитором многих протеинкиназ, в частности –

семейства протеинкиназ С и циклинзависимых киназ, в связи с чем роль пути PI3K/Akt/mTOR в реализации противоопухолевого действия этого препарата остается неясной.

#### **Ras/Raf/MEK/Erk/MAPK**

Ras/Raf/MEK/Erk/MAPK является наиболее важным путем передачи сигналов внешних стимулов, в том числе факторов роста и цитокинов, к клеточным эффекторным элементам.

Этот путь участвует в регуляции пролиферации и адгезии клеток, клеточной подвижности и дифференцировки. Этот же путь во многом определяет опухолевый фенотип клетки в процессе злокачественной трансформации [43].

В норме Ras – это мембраносвязанная ГТФаза, которая передает активирующий сигнал на серин/треонинкиназу Raf, а затем на киназу MEK. Последняя фосфорилирует и активирует киназу, регулирующую внеклеточным сигналом, Erk (**extracellular signal-regulated kinase**), входящую в семейство митоген-активируемых протеин киназ (МАРК).

Однако в опухолевой ткани достаточно часто (30–90 % опухолей различной локализации) обнаруживается постоянно активная форма этого фермента – результат активирующей мутации K-Ras, которая позволяет белку Ras самостоятельно генерировать псевдосигналы и имитировать активацию трансмембранных рецепторов (EGFR, PDGFR, c-Kit и др.).

Очевидно, в такой ситуации подавление активности вышестоящих рецепторов выглядит бесперспективной задачей: мутации K-Ras вызывают резистентность опухолей к блокаторам рецептора эпидермального фактора роста EGFR1 **цетуксимабу (Эрбитуксу)** и **панипумумабу (Вектибиксу)** и являются противопоказанием к их назначению.

Прерывания патологического сигнала можно попытаться достичь иным путем: либо подавлением активности самого «мутантного» белка, либо ингибированием нижестоящих компонентов сигнального пути.

Поскольку Ras функционирует только как мембраносвязанный белок, а для его транслокации в клеточную мембрану требуется посттрансляционная модификация его молекулы путем фарнезилирования ферментом фарнезил-трансферазой (ФТ), блокада активности ФТ может рассматриваться как способ подавления функций Ras, и ингибиторы ФТ являются одними из наиболее изученных потенциальных противоопухолевых средств этой группы.

Ингибитор ФТ **типифарниб (Zarnestra)** проявил противоопухолевую активность в экспериментах на животных [52], однако в начальных клинических исследованиях эффект препарата при опухолях с мутацией *K-Ras* оказался слабым [48]. Предполагается, что для торможения активности Ras при наличии такой мутации требуются более высокие дозы ингибитора, и, кроме того, опухоль может избегать эффекта типифарниба за счет передачи митогенного сигнала по альтернативным путям [7]. II фазу клинических испытаний проходят ингибиторы ФТ **лонафарниб (Sanasar)** – при раке молочной железы (РМЖ), раке органов головы и шеи, раке репродуктивных органов; и **BMS-214662** – при лейкозах [51].

Raf – это серин/треониновая киназа, активирующая мутация гена которой, как и в случае Ras, приводит к формированию злокачественного фенотипа клеток. Такие мутации обнаруживаются почти в 70% случаев меланомы и часто выявляются в солидных опухолях, например, колоректальном раке (КРР) и раке яичника [6]. Ингибитор Raf сорафениб (Нексавар), который также блокирует рецепторы эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF-R), – первый препарат этой группы, который уже разрешен для клинического применения. Показания: поздние стадии рака почки и неоперабельный рак печени. Разрешение выдано по результатам клинических исследований III фазы, в которых сорафениб (Нексавар) по сравнению с плацебо несколько удлинял общий срок выживания и выживаемость без прогрессирования больных с поздними стадиями рака почки [9] и рака печени [25].

МЕК – это киназа, фосфорилирующая остатки тирозина и серина/треонина и специфичная для активации Erk из семейства MAPK [32]. Активация МЕК выявлена в клетках широкого спектра опухолей человека, и создание селективных ингибиторов МЕК представляется перспективным направлением разработки противоопухолевых средств. В настоящее время на II фазе клинических испытаний находятся ингибиторы МЕК **PD0325901** (для лечения РМЖ, КРР, рака легкого, меланомы) и **AZD-6244** (для лечения КРР, рака печени, легкого, яичника, поджелудочной железы) [51].

#### Генераторы псевдомитогенных сигналов

В норме протеинкиназы приобретают ферментативную активность и трансактивируют «нижестоящие» белки после получения ими «вышестоящего» сигнала: связывания с лигандом (рецепторные) или фосфорилирования их молекулы «вышестоящими» киназами (нерецепторные протеинкиназы). Этим обеспечивается каскадный механизм передачи сигнала: последовательное фосфорилирование цепочки киназ проводит импульс активности, а их последующее дефосфорилирование под действием протеинфосфатаз инактивирует киназы, что абсолютно необходимо для их участия в передаче следующего сигнала. Если же такой инактивации не происходит, активная протеинкиназа перманентно посылает «нижестоящим» киназам один и тот же сигнал,

блокируя передачу других сигналов. Ситуация подобна «зависшему» на перекрестке светофору: движение открыто лишь по одной магистрали, а на примыкающих и пересекающих ее путях разрастаются безнадежные заторы. Выше описаны активирующие мутации генов *Ras* и *Raf*, в результате которых соответствующие белковые продукты из трансдукторов сигнала превращаются в его постоянно действующие генераторы. Аналогичная ситуация может произойти, если патологической активации подвергается киназа, в норме не участвующая в проведении сигнала. Практический интерес для онкологии представляют по крайней мере две таких киназы.

#### *Bcr/Abl*

В результате реципрокной транслокации t(9,22), известной как филадельфийская (Ph) хромосома (укорочение длинного плеча 22-й хромосомы), участок прото-онкогена *Abl* (Abelson) переносится с 9-й хромосомы на 22-ю, в локус и под промотор гена *Bcr* (breakpoint cluster region). Образовавшийся слитый ген *Bcr/Abl* продуцирует постоянно активную химерную тирозинкиназу с тем же названием, которая вне зависимости от наличия факторов роста стимулирует внутриклеточные пути передачи митогенных сигналов и вызывает избыточную пролиферацию клеток. Транслокация t(9,22) характерна для ХМЛ и наблюдается в ряде случаев ОЛЛ. Торможение активности *Bcr/Abl* подавляет пролиферацию и вызывает апоптоз Ph<sup>+</sup>-клеток при ОЛЛ и ХМЛ [46].

Ингибитор тирозинкиназы *Bcr/Abl* **иматиниб (Глибек)** был одним из первых ингибиторов протеинкиназ, внедренных в клиническую практику. Хотя препарат исходно разрабатывался как ингибитор киназы *Bcr/Abl*, он оказался активным в отношении других киназ, в частности – рецептора тромбоцитарного фактора роста PDGFR- $\alpha$  и рецептора фактора стволовых клеток c-Kit, и в настоящее время он разрешен для применения по целому ряду показаний, включая различные гемобластозы, GIST's и дерматофибросаркому. К сожалению, опыт практического использования **иматиниба (Глибека)** не только расширил область его применения, но и выявил достаточно быстро развивающуюся лекарственную резистентность к этому препарату. Среди причин развития резистентности ведущая принадлежит точечным мутациям, приводящим к аминокислотным заменам в белковой молекуле фермента. Так, мутация химерного гена *Bcr/Abl* T315I (одиночная замена Ц на Т в молекуле ДНК), в результате которой происходит замена треонина на изолейцин в положении 315 активного центра фермента *Bcr/Abl*, сопровождается его полной резистентностью к **иматинибу**. Аналогично, точечная мутация в 17 экзоне гена *c-KIT* приводит к аминокислотной замене D816V с формированием резистентности c-Kit к **иматинибу**. Наличие каждой из этих мутаций является абсолютным противопоказанием для назначения иматиниба при ХМЛ и Ph<sup>+</sup>-ОЛЛ, и GIST соответственно.

В попытках обойти резистентность к **Глибеку** создано его производное **нилотиниб (Тасigna)**, а также отличный по структуре неспецифический ингибитор протеинкиназ **дазатиниб (Спрайсел)**, которые оказались многократно активнее **иматиниба** как ингибитора *Bcr/Abl*, однако мутация T315I вызывает резистентность клеток и к этим ингибиторам. Оба препарата разрешены для лечения Ph<sup>+</sup> ОЛЛ и ХМЛ.

**Src**

Src – семейство свободных (не связанных с рецептором) цитозольных тирозинкиназ. Ген *Src* был первым из обнаруженных протоонкогенов. Накапливается все больше данных о роли Src в регуляции пролиферации и метастазирования опухолевых клеток [10]. Src опосредует передачу сигнала от рецепторов факторов роста к киназе фокальной адгезии FAK, киназам MAPK и PI3K/Akt/mTOR. Нарушение регуляции активности Src обнаружено в клетках ряда опухолей человека, в том числе РМЖ, КРР, НМРЛ, рака яичника и гемобластозов. Соответственно разработка средств, влияющих на активность Src, как противоопухолевых лекарств представляет большой интерес и ведется достаточно активно.

В настоящее время разрешен для клинического применения упомянутый выше дазатиниб (*Спрайсел*), являющийся неспецифическим ингибитором Src, Vcr/Abl, c-Kit и других протеинкиназ, что послужило основанием для исследований по применению препарата при солидных опухолях [20]. Аналогичный ингибитор босутиниб (*SKI-606*) проходит II фазу клинических испытаний при РМЖ и ХМЛ, и ряд препаратов перешли от доклинических исследований к I фазе клинических испытаний [51].

**Митотические киназы**

Клинический успех препаратов, разрушающих тубулиновые микротрубочки (алкалоиды Винка) или, напротив, вызывающих стабилизацию их динамичной структуры (таксаны), подтверждает пригодность стратегии противоопухолевой терапии, направленной на нарушение процесса митоза. Новый подход к продолжению этой стратегии связан с применением ингибиторов ферментов, регулирующих процесс митоза, и блокаторов транспортных белков, осуществляющих расхождение клеточных органелл в процессе клеточного деления.

Среди ферментов, регулирующих процесс митоза, особое внимание привлекает семейство митотических киназ Aurora, включающее три серин/треониновые киназы (Aurora –A, –B и –C), которые имеют разную внутриклеточную локализацию и функции. В регуляции расхождения хромосом участвуют киназы –A и –B [3]. Для разработки противоопухолевых средств наиболее перспективной мишенью представляется киназа Aurora-A, экспрессия которой усилена во многих типах опухоли [50]. Нокаут или мутация гена этой киназы приводит к остановке митоза и развитию апоптоза, в то время как торможение активности киназы Aurora B приводит к формированию полиплоидных, многоядерных, аномально крупных клеток.

В настоящее время на II фазе клинических испытаний находятся неселективный ингибитор протеинкиназ семейства Aurora **данусертиб (PHA-739358)** [12] и высокоактивный селективный ингибитор киназы Aurora-B – производное пиразолохиназолина **AZD-1152** [34]. **Данусертиб** также подавляет активность Vcr/Abl-киназы, причем эффективен при наличии мутации T315I, и проявляет синергизм с **иматинибом** (см. выше). Оба препарата предполагается использовать для лечения лейкозов, в том числе резистентных к другим типам ингибиторов киназ.

В качестве перспективной мишени для противоопухолевой терапии представляет интерес кинетический белок веретена деления KSP – член семейства белков-кинезинов, нарушение функций которого приводит к остановке митоза и апоптозу [4]. Селективный ингибитор KSP **испинесиб (SB-715992)** в комбинации с доцетакселом в настоящее

время проходит II фазу клинических испытаний для лечения меланомы и сквамозноклеточного рака органов головы и шеи [51].

**Эпигенетические регуляторы экспрессии генов**

Экспрессия многих генов регулируется на эпигенетическом уровне за счет обратимых процессов ацетилирования/деацетилирования ядерных белков – гистонов, а также метилирования цитозинового остатков молекулы ДНК. В этой связи представляют интерес вещества, способные модифицировать или как-то влиять на эти регуляторные процессы.

Гистоны – это группа основных белков хроматина, образующих с молекулой ДНК пространственные комплексы (нуклеосомы), плотность упаковки которых определяется количеством ацетильных групп в гистоне: при малом содержании таких групп комплекс гистон-ДНК упакован плотно и считывание генов затруднено – экспрессия генов подавлена; при добавлении ацетильных групп связь гистона с ДНК становится менее плотной, что позволяет факторам транскрипции связаться с регуляторной областью молекулы ДНК и запустить транскрипцию – гены экспрессируются. Разнонаправленные процессы ацетилирования/деацетилирования осуществляются парой ферментов: гистоновой ацетилтрансферазой и гистоновой деацетилазой (ГДА), баланс активностей которых обеспечивает ремоделирование хроматина и управляемость каскадами генной экспрессии.

Метилирование цитозинового остатков в последовательностях ЦфГ (Цитидил-фосфат-Гуанозин) осуществляет фермент ДНК-метилтрансфераза (ДМТ). Островки ЦфГ часто расположены внутри или вблизи последовательностей промоторов, их метилирование приводит к необратимой блокаде экспрессии соответствующих генов.

Таким образом, деацетилирование гистонов и метилирование цитозинового ДНК подавляет активность генов, а ответственные за эти процессы ферменты ГДА и ДМТ могут оказаться эффективными мишенями для противоопухолевой терапии. Кроме того, установлено, что ДМТ и ГДА, помимо их указанных функций, могут прямо взаимодействовать друг с другом, образуя тетрамерный комплекс с транскрипционными факторами Rb и E2F1, что подавляет транскрипцию E2F-респонсивных генов [40].

Среди лекарственных препаратов, которые следует рассматривать как регуляторы экспрессии генов, изучены и продвинуты в клиническую практику ингибиторы ГДА, которые химически относятся к разным группам, но имеют общее свойство – способность связываться с цинксодержащим каталитическим доменом фермента. Их действие приводит к активации ряда генов, белковые продукты которых являются ингибиторами прогрессии клеточного цикла (p21<sup>WAF-1</sup>, p16<sup>INK-4a</sup>, p14<sup>ARF</sup>), лигандами смерти и их рецепторами (FasL, TRAIL, CD95, DR4, DR5), активаторами апоптоза (Bax, Bak, Bim); а так же приводит к репрессии генов, кодирующих циклины (D1, A, TS), антиапоптогенные белки (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) и цитокины (HIF-1α, VEGF, PDGF, IL2, IL10). Обнаружено повышение уровня экспрессии ингибиторов ангиогенеза (активин А, нейрофибрин 2, тромбоспондин 1) и подавление экспрессии рецепторных (EGFR1, ErbB2) и нерцепторных (Abl, Akt, Raf) протеинкиназ [21; 24]. Результатом действия ингибиторов ГДА является остановка клеточного цикла, активация программы клеточной гибели, а в некоторых случаях происходит дифференцировка клеток.

Первый противоопухолевый препарат группы производных гидроксаминной кислоты – **вориностат (Zolinz)** – разрешен для лечения первичной кожной Т-клеточной лимфомы [29], а в рамках III фазы клинических испытаний исследуется его применение в комбинации с карбоплатином и паклитакселом при поздних стадиях НМРЛ и в монорежиме во 2-й линии терапии мезотелиомы. В рамках II фазы исследуется возможность его применения при других солидных опухолях и гемобластозах [47]. На II фазе клинических испытаний находится ряд препаратов этой группы – **белиностат (PXD101)**, **панобиностат (LBH589)** и другие, которые изучаются как потенциальные средства лечения солидных опухолей различных локализаций и гемобластозов [33].

Среди ингибиторов ГДА других химических групп наиболее продвинуты производные бензамидов, один из которых (**CI-994**) перешел на III фазу клинических испытаний для лечения НМРЛ, а в рамках II фазы изучается его применение при раке поджелудочной железы и множественной миеломе [14]. II фазу клинических испытаний проходит еще один препарат этой группы, (**MS-275**), на этой же стадии разработки находится ряд препаратов других химических групп, в том числе короткоцепочечные жирные кислоты: **фенилбутират (Bufenil)** – для лечения КРР, лейкозов, миелодиспластического синдрома (МДС) и опухолей мозга, и **вальпроевая кислота (Depakote)** – для лечения солидных опухолей различных локализаций, а также циклический тетрапептид **депсицептид (Romidepsin)** – по тем же показаниям и для лечения гемобластозов [47].

Ингибиторы ДМТ **5-азацитидин (Вайдаза)** и его дезоксипроизводное 5-аза-2'-деоксицитидин (**децитабин; Дакоген**) разрешены для лечения МДС. Интересно, что первоначально эти препараты разрабатывались как классические цитостатики группы антиметаболитов, которые предполагалось применять в значительно более высоких дозах для лечения лейкозов. Эти аналоги цитозина встраиваются в ДНК (а 5-азацитидин – и в РНК) вместо цитозина при репликации (и транскрипции), в результате чего нарушается структура и функции нуклеиновых кислот. В таком качестве оба препарата проходят II фазу клинических испытаний. В ключевом исследовании, на результатах которого основывалось разрешение на применение **5-азацитидина** при МДС, препарат в сравнении с наилучшей поддерживающей терапией удлинял медиану общего срока выживания и улучшал качество жизни больных при частоте гематологического эффекта 23 % [45]. Аналогичные эффекты достигнуты в исследовании **децитабина** [19]. Основные направления дальнейших исследований в этой области связаны с разработкой химически более стабильных препаратов, пригодных для перорального применения [30], а также с разработкой ненуклеозидных ингибиторов ДМТ, обладающих меньшей токсичностью, чем **5-азацитидин** [15].

#### Репарация повреждений ДНК

Поли(АДФ-рибоза)полимераза – PARP – фермент репарации, распознающий и восстанавливающий участки повреждения ДНК [38]. Повышенная активность PARP сопровождается резистентностью опухолей к факторам, повреждающим ДНК, в том числе – к препаратам платины, алкилирующим агентам, ингибиторам топоизомеразы и ионизирующему излучению. Ингибиторы PARP являются радиосенсибилизаторами и усиливают противоопухолевый эф-

фект химиотерапевтических препаратов *in vitro* и *in vivo*. Активность PARP проявляется только в присутствии кофактора – никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>), поэтому основное внимание при разработке ингибиторов PARP уделяется веществам, конкурирующим с НАД<sup>+</sup> за связывание с PARP. Первым препаратом этой группы был конкурентный ингибитор связывания НАД<sup>+</sup> **AG-014699** [2]. В рамках II фазы клинических испытаний этот препарат в комбинации с темозоломидом применялся для лечения метастатической меланомы, и у 18 % больных достигнут частичный эффект, что, однако, сопровождалось резким усилением вызванной темозоломидом токсичности [36]. Все же способность ингибиторов PARP усиливать эффекты темозоломида и преодолевать резистентность к этому препарату вызывает интерес, поэтому в настоящее время проводятся исследования применения **AG-014699** и другого ингибитора PARP – **BSI-201** в комбинации с темозоломидом во 2-й линии терапии опухолей, резистентных к темозоломиду, в том числе – при нейробластоме, глиобластоме и других опухолях мозга [5]. Полагают, что наибольшая эффективность ингибиторов PARP может быть достигнута у больных с наследственными формами рака, сопряженными с мутациями генов **BRCAl/2**, а также при применении их в комбинации с другими препаратами, повреждающими ДНК [26]. Так, препарат **олапариб (Olaparib)** успешно прошел II фазу клинических испытаний, показав активность при наследственных формах РМЖ и рака яичника.

#### Регуляторы экспрессии и активности белков Белок теплового шока HSP90

HSP90 – это сервисный белок, способствующий формированию корректной трехмерной структуры и адекватному функционированию клеточных белков, в том числе рецепторов факторов роста, нерецепторных протеинкиназ Raf и Akt, а также регуляторного белка HIF-1 $\alpha$  [37]. Вне клеточного стресса HSP90 присутствует в клетке на некотором базальном уровне, достаточном для выполнения его функций (фолдинг вновь синтезированных белков, их трансмембранный перенос). Под влиянием внешних факторов (тепла, гипоксии, окислительного стресса, облучения, воздействия свободных радикалов и солей тяжелых металлов), при которых ожидается массовое появления поврежденных белковых молекул, активируются гены теплового шока и тиражируются их белковые продукты, в том числе – HSP90, предназначенные для восстановления конформации поврежденных белков путем АТФ-зависимой денатурации/ренатурации (рефолдинга) их третичной структуры.

Экспрессия HSP90 повышена во многих опухолях, с чем связана селективность накопления ингибиторов HSP90 в опухолевой ткани [22]. Подавление экспрессии и/или снижение функциональной активности HSP90 сопровождается накоплением в клетке поврежденных, частично денатурированных белков с измененными биологическими функциями. Предполагается, что, подобно ингибиторам PARP, ингибиторы HSP90 как противоопухолевые средства могут быть наиболее эффективны в комбинации с цитостатиками для усиления их эффекта или преодоления лекарственной резистентности. В настоящее время комбинация ингибитора HSP-90 **танеспимицина (KOS-953)** с трастузумабом проходит III фазу клинических испытаний для лечения резистентного к трастузумабу РМЖ, а в рамках II фазы клинических испытаний изучается возможность применения комбинации препарата с **бортезомибом** (см. ниже) при множественной миеломе [8].

Также на II фазе клинических испытаний находится ингибитор HSP-90 **ретаспимицин (IPI-504)**, который применяется в комбинации с цитостатиками для лечения различных солидных опухолей и гемобластозов [51].

#### Система убиквитин-протеасома

Протеасома – не зависящая от лизосом клеточная органелла, в которой осуществляется фрагментация клеточных белков, конъюгированных с убиквитином. Последний представляет собой низкомолекулярный белок, играющий роль своеобразной «черной метки», которой метятся белки, предназначенные для расщепления в протеасоме [1].

Система убиквитин-протеасома играет важную роль в контроле внутриклеточного содержания белков, расщепляя как поврежденные белки, так и те нативные и вполне работоспособные белковые молекулы, сиюминутная необходимость в которых отпала, в том числе участвующие в регуляции циклических процессов клеточного деления, передачи сигналов, дифференцировки и восстановления ДНК. Именно протеасома расщепляет утилизируемые ею внутриклеточные белки до антигенных пептидов, которые впоследствии экспонируются на клеточной поверхности и распознаются главным комплексом гистосовместимости иммунокомпетентных клеток в качестве сигнала «свой – чужой».

Поскольку система убиквитин-протеасома, как и белок HSP90, контролирует многие регуляторные процессы, подавление ее активности приводит к накоплению в клетке поврежденных белков, нарушению передачи сигналов по различным сигнальным путям, подавлению репарации ДНК, замедлению пролиферации клеток, апоптозу.

Первым и пока единственным ингибитором протеасом, достигшим клинического применения, является **бортезомиб (Велкейд)**.

#### Литература

1. *Burger A.M., Seth A.K.* The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications // *Eur J Cancer*. – 2004. – 40. – P. 2217–29.
2. *Calabrese C.R., Almasy R., Barton S. et al.* Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361 // *J Natl Cancer Inst*. – 2004. – 96. – P. 56–67.
3. *Carvajal R.D., Tse A., Schwartz G.K.* Aurora kinases: new targets for cancer therapy // *Clin Cancer Res*. – 2006. – 12. – P. 6869–75.
4. *Cox C.D., Breslin M.J., Mariano B.J. et al.* Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. pt 1: The discovery of 3,5-diaryl-4,5-dihydropyrazoles as potent and selective inhibitors of the mitotic kinesin KSP // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2005. – 15. – P. 2041–5.
5. *Daniel R.A., Rozanska A.L., Thomas H.D. et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 enhances temozolomide and topotecan activity against childhood neuroblastoma // *Clin Cancer Res*. – 2009. – 15(4). – P. 1241–9.
6. *Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer // *Nature*. – 2002. – 417. – P. 949–54.
7. *End D.W., Smets G., Todd A.V. et al.* Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro // *Cancer Res*. – 2001. – 61. – P. 131–7.
8. *Erlichman C.* Tanespimycin: the opportunities and challenges of targeting heat shock protein 90 // *Expert Opin Investig Drugs*. – 2009. – 18(6). – P. 861–8.
9. *Escudier B., Eisen T., Stadler W.M. et al.* Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma // *N Engl J Med*. – 2007. – 356. – P. 125–34.
10. *Frame M.C.* Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour // *Biochim Biophys Acta*. – 2002. – 1602. – P. 114–30.
11. *Gills JJ, Dennis PA.* Perifosine: update on a novel Akt inhibitor // *Curr Oncol Rep*. – 2009. – 11(2). – P. 102–10.
12. *Gontarewicz A., Вrѳttendorf T.H.* Danusertib (formerly PHA-739358) – a novel combined pan-Aurora kinases and third generation Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor // *Recent Results Cancer Res*. – 2010. – 184. – P. 199–214.
13. *Granville C.A., Memmott R.M., Gills J.J., Dennis P.A.* Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway // *Clin Cancer Res*. – 2006. – 12. – P. 679–89.
14. *Gridelli C., Rossi A., Maione P.* The potential role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer // *Crit Rev Oncol Hematol*. – 2008. – 68(1). – P. 29–36.
15. *Hellebrekers D.M., Griffioen A.W., van Engeland M.* Dual targeting of epigenetic therapy in cancer // *Biochim Biophys Acta*. – 2007. – 1775. – P. 76–91.

Это производное борной кислоты тормозит расщепление в протеасомах ряда белков, в том числе IκB – ингибитора антиапоптогенного транскрипционного фактора NF-κB, что приводит к остановке пролиферации и активации апоптоза. Эффект бортезомиба проявляется независимо от резистентности клеток к цитостатикам [41]. **Бортезомиб (Велкейд)** разрешен для применения во 2-й линии терапии у больных ММ и мантийно-клеточной лимфомой [18], а также в 1-й линии лечения больных ММ в составе комбинированной терапии с мелфаланом и преднизолоном [42]. Другие ингибиторы протеасом пока находятся на ранних стадиях разработки.

#### Выводы

Таким образом, экспериментальные и клинические исследования последнего времени вывели в практику полтора десятка лекарственных препаратов нового поколения, которые принято именовать «таргетными», подчеркивая этим их молекулярную направленность. Значительно большее количество активных веществ с подобными механизмами действия находятся на разных стадиях разработки, в связи с чем в скором времени следует ожидать пополнения арсенала средств химиотерапии опухолей новыми препаратами. Эти лекарства не противопоставляются лекарственным средствам классической химиотерапии, а дополняют их, в ряде случаев повышая эффективность и снижая побочные эффекты последних. В то же время, исследования молекулярных механизмов действия этих соединений вскрывают «мультитаргетность» большинства из них, что дезавуирует их принадлежность к «таргетным». Видимо, истинно «таргетными» препаратами являются антигеннонацеленные моноклональные антитела и лекарственные средства, созданные на их основе.

16. Hudes G., Carducci M., Tomczak P. et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma // *N Engl J Med.* – 2007. – 356. – P. 2271–81.
17. Jimeno A., Tan A.C., Coffa J. et al. Coordinated epidermal growth factor receptor pathway gene overexpression predicts epidermal growth factor receptor inhibitor sensitivity in pancreatic cancer // *Cancer Res.* – 2008. – 68. – P. 2841–9.
18. Kane R.C., Dagher R., Farrell A. et al. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma // *Clin Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 5291–4.
19. Kantarjian H., Issa J.P., Rosenfeld C.S. et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study // *Cancer* – 2006. – 106. – P. 1794–03.
20. Kim L.C., Rix U., Haura E.B. Dasatinib in solid tumors // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2010. – 19(3). – P. 415–25.
21. Kim T.Y., Bang Y.J., Robertson K.D. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy // *Epigenetics* – 2006. – 1. – P. 14–23.
22. Kitano H. Cancer robustness: tumour tactics // *Nature.* – 2003. – 426. – P. 125.
23. Kondapaka S.B., Singh S.S., Dasmahapatra G.P. et al. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation // *Mol Cancer Ther.* – 2003. – 2. – P. 1093–103.
24. Liang D., Kong X., Sang N. Effects of histone deacetylase inhibitors on HIF-1 // *Cell Cycle.* – 2006. – 5. – P. 2430–5.
25. Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma // *N Engl J Med.* – 2008. – 359. – P. 378–90.
26. Lord C.J., Garrett M.D., Ashworth A. Targeting the double-strand DNA break repair pathway as a therapeutic strategy // *Clin Cancer Res.* – 2006. – 12. – P. 4463–8.
27. Ma W.W., Hidalgo M. Exploiting novel molecular targets in gastrointestinal cancers // *World J Gastroenterol.* – 2007. – 13. – P. 5845–56.
28. Ma W.W., Jimeno A. Temsirolimus // *Drugs Today (Barc).* – 2007. – 43. – P. 659–69.
29. Mann B.S., Johnson J.R., Cohen M.H. et al. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma // *Oncologist* – 2007. – 12. – P. 1247–52.
30. Marquez V.E., Kelley J.A., Agbaria R. et al. Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy // *Ann N Y Acad Sci.* – 2005. – 1058. – P. 246–54.
31. Motzer R.J., Escudier B., Oudard S. et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial // *Lancet* – 2008. – 372. – P. 449–56.
32. Ohren J.F., Chen H., Pavlovsky A. et al. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition // *Nat Struct Mol Biol.* – 2004. – 11. – P. 1192–7.
33. Piekarczyk R.L., Bates S.E. Epigenetic modifiers: basic understanding and clinical development // *Clin Cancer Res.* – 2009. – 15(12). – P. 3918–26.
34. Pinel S., Barbault-Foucher S., Lott-Desroches M.C., Astier A. Inhibitors of aurora kinases // *Ann Pharm Fr.* – 2009. – 67(2). – P. 69–77.
35. Plas D.R., Thompson C.B. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving // *Oncogene* – 2005. – 24. – P. 7435–42.
36. Plummer R., Lorigan P., Evans J. et al. First and final report of a phase II study of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide (TMZ) in patients with metastatic malignant melanoma (MM) [abstract] // *J Clin Oncol.* – 2006. – 18S(suppl). – P. 8013.
37. Queitsch C., Sangster T.A., et al. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation // *Nature* – 2002. – 417. – P. 618–24.
38. Ratnam K., Low J.A. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology // *Clin Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 1383–8.
39. Rizzieri D.A., Feldman E., Dipersio J.F. et al. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies // *Clin Cancer Res.* – 2008. – 14(9). – P. 2756–62.
40. Robertson K.D., Ait-Si-Ali S., Yokochi T. et al. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters // *Nat Genet.* – 2000. – 25. – P. 338–42.
41. Russo A., Fratto M.E., Bazan V. et al. Targeting apoptosis in solid tumors: the role of bortezomib from preclinical to clinical evidence // *Expert Opin Ther Targets* – 2007. – 11. – P. 1571–86.
42. San Miguel J.F., Schlag R., Khuageva N.K. et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma // *N Engl J Med.* – 2008. – 359. – P. 906–17.
43. Sebolt-Leopold J.S., Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer // *Nat Rev Cancer* – 2004. – 4. – P. 937–47.
44. Senderowicz A.M. Inhibitors of cyclin-dependent kinase modulators for cancer therapy // *Prog Drug Res.* – 2005. – 63. – P. 183–206.
45. Silverman L.R., Demakos E.P., Peterson B.L. et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B // *J Clin Oncol.* – 2002. – 20. – P. 2429–40.
46. Stegmeier F., Warmuth M., Sellers W.R., Dorsch M. Targeted cancer therapies in the twenty-first century: lessons from imatinib // *Clin Pharmacol Ther.* – 2010. – 87(5). – P. 543–52.
47. Tan J., Cang S., Ma Y. et al. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents // *J Hematol Oncol.* – 2010. – 3. – P. 5–10.
48. Van Cutsem E., van de Velde H., Karasek P. et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer // *J Clin Oncol.* – 2004. – 22. – P. 1430–8.
49. Van Ummersen L., Binger K., Volkman J. et al. A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer // *Clin Cancer Res.* – 2004. – 10. – P. 7450–6.
50. Warner S.L., Gray P.J., Von Hoff D.D. Tubulin-associated drug targets: Aurora kinases, Polo-like kinases, and others // *Semin Oncol.* – 2006. – 33. – P. 436–48.
51. Wen W. Ma et al. Novel Agents on the Horizon for Cancer Therapy // *CA Cancer J Clin.* – 2009. – 59. – P. 111–37.
52. Zhu K., Hamilton A.D., Sebti S.M. Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: current status // *Curr Opin Investig Drugs.* – 2003. – 4. – P. 1428–35.

Материалы III Всероссийской научной конференции  
с международным участием «Наноонкология».  
Саратов, 6–7 сентября 2011 г.

## ТЕЗИСЫ

Ю.А. Аветисян<sup>1,2</sup>, А.Н. Якунин<sup>1,2,3</sup>, В.В. Тучин<sup>1,2</sup>

### ТЕРМООПТИКА КОМПОЗИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЯХ

<sup>1</sup>Институт проблем точной механики и управления  
РАН, Саратов

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет им.  
Н.Г. Чернышевского, Саратов

<sup>3</sup>Саратовский государственный технический уни-  
верситет, Саратов

**Задачи исследования.** В настоящее время активно исследуется возможность использования плазмонно-резонансных наночастиц в онкологии для лазерного фототермолиза раковых клеток, маркированных такими наночастицами. Вместе с тем, детального изучения кинетики локального распределения температурного поля как в пределах самих поглощающих наночастиц, так и в непосредственной близости от них, насколько нам известно, выполнено не было. Решение этой задачи представляет особый интерес для разработки эффективных алгоритмов управления температурными эффектами на масштабах соизмеримых и меньших размеров наночастиц, что и составляет цель настоящей работы.

**Материалы и методы.** В настоящей работе на основании решения нестационарного уравнения теплопроводности теоретически исследовалась возможность эффективного термического воздействия импульсного лазерного излучения (с длиной волны ~800нм) на клеточную мембрану в области ее соприкосновения с композитными наночастицами – типичными для экспериментов сферическими наноболочками, состоящими из диэлектрического ядра (из плавленого кварца радиусом ~70нм) и золотого покрытия (толщиной ~15нм).

**Результаты и выводы.** При облучении рассмотренных наночастиц серий импульсов линейно поляризованного лазерного света пикосекундного диапазона существует эффект пространственно-временной локализации температурного поля, характеризующийся следующим:

1. Температурное поле, возникающее в объеме собственно наночастицы и в непосредственной близости от нее, имеет выраженную пространственную неоднородность, которая нарастает во время каждого отдельного импульса накачки и существует некоторое время (~50 пс) после его завершения, что определяет ее «время жизни».

2. Нарушается радиальная симметрия распределения температуры относительно центра наноболочки, что приводит к заметной неравномерности нагрева наружной поверхности наночастицы и возникновению на ней «горячей» зоны в форме обруча, лежащего в плоскости, ортогональной вектору поляризации облучающего света.

Обнаруженная пространственно-временная локализация температурного поля должна учитываться в таких приложениях, как дефрагментация наноболочек, лазерная оптопорация клеток, фототермолиз раковых клеток и бактерий, а также фототермическое вскрытие микро- и нанокапсул с лекарственными препаратами. Использование эффекта пространственно-временной локализации температурного поля перспективно с точки зрения ми-

нимизации травмирующего действия повышенной температуры на живую ткань и предоставляет дополнительные возможности прецизионного управления названными выше процессами.

А.Г. Аюнджанов, В.Ю. Науменко, А.И. Сергеев,  
Н.Л. Шимановский

### ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЛОЖНОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (МАГНЕТИТА) В КАЧЕСТВЕ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОГО КОНТРАСТНОГО СРЕДСТВА ПРИ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ

Российский государственный медицинский универ-  
ситет им. Н.И. Пирогова, Москва

**Задачи исследования.** Наночастицы магнитных материалов, а также системы, в которых магнитные наночастицы распределены в немагнитной среде, представляют большой интерес для современной медицины и фармакологии при разработке методов лечения и диагностики различных заболеваний, в том числе онкологических.

Соизмеримость размера наночастицы и магнитного домена магнетита приводит к появлению явления суперпарамагнетизма. У наночастиц магнетита происходит существенное изменение магнитных свойств с уменьшением размера частиц.

Водные растворы магнетита со средним размером 20–50 нм обладают ферримагнитными свойствами, а при размерах соизмеримых с размером магнитного домена – 5–12 нм суперпарамагнитными.

Такие наночастицы магнетита могут стать оптимальной субстанцией магнитно-резонансного контрастного средства, позволяющего наблюдать очаги заболеваний по двум релаксационным параметрам, в отличие от гадолиний содержащих препаратов.

В связи с этим в работе была поставлена задача разработать способ получения наночастиц магнетита и изучить их способность изменять релаксации T1 и T2, т.е. оказывать контрастирующий эффект при проведении МРТ.

**Материалы и методы.** Исследуемые водные растворы наночастиц магнетита различных размеров были получены химическим способом. В данной работе в качестве ПАВа, останавливающего рост зародышей, использовали лимонную кислоту, которая не обладает оптимальными поверхностно-активными свойствами, но приемлема с биологической точки зрения. В качестве стабилизатора структуры применялся цитрат натрия. Конечное значение pH контрастной жидкости должно соответствовать pH крови.

**Результаты.** Были исследованы два водных раствора магнетита со средними диаметрами 8,2 и 21,2 нм. Размер частиц определялся с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Парамагнитные (контрастные) сверхмалые наночастицы оксида железа размером 8,2 нм (предварительное название Феротраст) мы сравнили с железосодержащим контрастным средством Резовистом (Байер Шеринг Фарма АГ). Анализ полученных результатов показал, что T1-релаксирующая активность Феротраста выше, чем у Резовиста (см. таблицу).

Таблица  
Влияние Феротраста и Резовиста на времена релаксации протонов воды (рН 7,3, Т 23 °С)

Концентрация железа, г/л	T1, мсек		T2, мсек	
	Феротраст	Резовист	Феротраст	Резовист
5,0	5,0 ± 0,2*	8,7 ± 0,3	0,55 ± 0,1*	0,31 ± 0,1
0,50	34 ± 3,0*	43,0 ± 3,0	6,2 ± 0,4	5,3 ± 0,4
0,25	54,0 ± 4,0*	68,0 ± 6,0	12,8 ± 0,5*	10,1 ± 0,4

\*статистически значимые отличия раствора от Резовиста при  $p \leq 0,05$ .

Исследования, проведенные на лабораторных животных, крысах с онкологическим образованием, показали контрастирующую способность препарата на основе наночастиц сложного оксида железа, а также важнейшее свойство Феротраста накапливаться в опухоли.

**Выводы.** Разработан способ получения наночастиц оксида железа (Феротраст), обладающий более высокой T1-релаксирующей активностью по сравнению с аналогом Резовистом и способностью контрастировать опухоль при проведении МРТ.

*В.В. Алипов, М.С. Лебедев, Х.М. Цацаев, Е.А. Добрейкин, Н.В. Алипов, А.И. Урусова*  
**ЛАЗЕРНЫЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ ПЕЧЕНИ ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов**

Одним из актуальных и перспективных направлений в экспериментальной онкохирургии является применение лазерного фототермолиза с использованием светопоглощающих наночастиц.

**Цель исследования.** Разработать и экспериментально обосновать эндоскопические технологии доставки наночастиц меди и лазерного излучения для лечения моделированных образований печени.

**Материалы и методы.** Для разработки способов доставки наночастиц меди к печени и последующему проведению лазеротерапии проведены серии экспериментов на 85 лабораторных животных (кролики-самцы и белые крысы). Подведение наночастиц к печени проводилось путем выполнения чрескожной пункции в установленной проекции соответствующей доли печени под ультразвуковым контролем (УЗК).

**Результаты.** В результате 25 экспериментов разработан и запатентован способ моделирования кисты печени с помощью двухканального катетера с баллоном. Применение лазерного излучения («Лазермед- 0110») мощностью 10 Вт позволило экспериментально обосновать целесообразность «лазерной поддержки», что исключает возможность осложнений (кровотечение и желчеистечение) пункции. Экспериментально установлено, что введение в полость кисты печени наночастиц меди и применение низкоинтенсивного лазерного излучения ликвидирует микробную обсемененность, приводит к ускорению облитерации полости и замещению её соединительной тканью по сравнению со стандартными методами лечения на 4–5 суток соответственно.

**Заключение.** Разработаны способы моделирования новообразования печени и малоинвазивной пункции его под контролем УЗИ. Местное введение наночастиц меди в полость моделированной кисты печени и лазерное облучение её в ИК-диапазоне сокращает сроки её закрытия, является профилактикой гнойно-воспалительных осложнений. В перспективе подобный метод может быть применен и при лечении метастазов печени.

*Н.Ю. Анисимова, Ю.И. Должикова, В.А. Даванков, М.И. Будник, М.В. Киселевский*

### ОЦЕНКА ГЕМОСОВМЕСТИМОСТИ СВЕРХСШИТЫХ ПОЛИСТИРОЛОВ СЕРИИ СТИРОСОРБ

*РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

**Задачи исследования.** В настоящее время в качестве неселективного сорбента широкое применение получил модифицированный активированный уголь. Однако показатели биосовместимости этого соединения не являются оптимальными: при контакте гранул этого сорбента с клетками крови отмечается гемолиз эритроцитов и активация агрегации тромбоцитов. Современные достижения в области разработки новых материалов с использованием нанотехнологий расширили спектр потенциально перспективных гемосорбентов. Сверхсшитые полистиролы ряда Стиросорб благодаря наличию нано-, микро- и мезопор на поверхности гранул способны элиминировать из биологических жидкостей широкий спектр биологически активных молекул. Целью настоящего исследования являлась оценка гемосовместимости сорбентов ряда Стиросорб.

**Материалы и методы.** Тестируемые сорбенты Стиросорб MN 514, Стиросорб MMN200, которые представляли собой гранулы диаметром 0,3–1,0 мм с развитой внутренней структурой, промывали этанолом, стерильной водой и физиологическим раствором хлорида натрия. В качестве контроля использовали угольный сорбент колонки Adsorba, Sweden. Подготовленными сорбентами (1,3–1,5 г) набивали макеты гемосорбционных колонок через которые фильтровали кровь здорового донора объемом 5 мл. Забор проб для исследования осуществляли через каждые 5 циклов рециркуляции. Оценивали динамику гемолиза эритроцитов и гибель лейкоцитов методом колориметрии, а также агрегацию тромбоцитов методом световой микроскопии.

**Результаты и выводы.** Полученные данные свидетельствуют о снижении на 28–33 % интенсивности гемолиза эритроцитов и агрегации тромбоцитов в 1,5–1,9 раз при трансфузии через колонки с сорбентами Стиросорб в сравнении с контролем. Воздействие всех трех протестированных сорбентов на гибель лейкоцитов крови было сравнимым по степени интенсивности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что протестированные сорбенты Стиросорб MN 514 и Стиросорб MMN200 при гемоперфузии оказывают на эритроциты и лейкоциты человека менее повреждающее действие, чем активированный уголь, широко применяемый для гемосорбции. Этот факт, наряду с установленной ранее способностью эффективно элиминировать из кровотока различные токсины, в том числе бактериальные, а также широкий спектр про- и противовоспалительных факторов позволяет рассматривать эти материалы как перспективные для применения в качестве гемосорбентов в медицинской и ветеринарной практике.

*Н.Ю. Анисимова, Ю.И. Должикова, В.А. Даванков, М.И. Будник, М.В. Киселевский*

### ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СОРБЕНТОВ СЕРИИ СТИРОСОРБ В ТЕРАПИИ ГРИБКОВОГО СЕПСИСА

*РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

**Задачи исследования.** Ранее проведенные исследования дали основания предполагать возможность элиминации из крови неселективными сорбентами (активированный уголь, сверхсшитые полистиролы) бактериальных клеток различных ви-

дов. Этот факт, наряду с возможностью сорбции этими материалами широкого спектра медиаторов воспаления, позволяет рассматривать указанные соединения как перспективные для применения в терапии гнойно-септических осложнений. Как известно, в качестве триггерных факторов развития сепсиса могут выступать не только бактерии, но и грибы. Целью данного исследования явилось изучение возможности элиминации сверхсшитыми полистиролами серии Стиросорб клеток грибов. Гранулы сорбентов этой серии имеют развитую внутреннюю и поверхностную структуру, представляющую нано-, микро- и мезо порами, что обеспечивает их большую сорбционную емкость.

**Материалы и методы.** В данном исследовании тестировали образцы Стиросорб MN 514, Стиросорб MMN 200 и угольный сорбент, являющийся основой колонки Adsorba, Sweden. Сорбентами, промытыми в этиловом спирте и физиологическом растворе, набивали макеты сорбционных колонок. 15 мл суспензии дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* в физиологическом растворе пропускали по 9 раз через модели колонок. Далее готовили мазки из исходной суспензии и контактировавшей с тестируемыми сорбентами, затем окрашивали их по методу Романовского – Гимзы и определяли относительное количество живых клеток. Кроме того, до и после перфузии определяли концентрацию клеток дрожжей в суспензии.

**Результаты и выводы.** Опираясь на данные об изменении концентрации дрожжевых клеток после перфузии, можно заключить, что исследуемые сорбенты обладают высокой способностью иммобилизовать на своей поверхности клетки дрожжей. Наибольшую эффективность показал Стиросорб MN 514, сокративший концентрацию клеток в 5,5 раз относительно интактного контроля. Стиросорб MMN 200 способствовал снижению числа дрожжей в 4,2 раз, а угольный сорбент – в 3,9 раз. Кроме того, было обнаружено уменьшение относительно интактного контроля количества живых клеток грибов: на 22 % при использовании Стиросорб MN 514 и угольного сорбента, на 10 % – Стиросорб MMN 200, что, вероятно, являлось следствием повреждения стенки микроорганизма. Учитывая полученные ранее результаты о высоком уровне биосовместимости исследуемых образцов, можно прийти к выводу о возможности рассмотрения наносорбентов серии Стиросорб в качестве перспективных гемосорбентов для лечения больных с сепсисом, являющимся частой причиной смерти онкологических больных в послеоперационный период.

*А.А. Бабаев, А.В. Алясова, Е.Ю. Контрощикова, А.Ю. Барышников, В.В. Новиков*

#### **СУММАРНАЯ И ОЛИГОМЕРНАЯ ФРАКЦИИ РАСТВОРИМОЙ МОЛЕКУЛЫ CD16 ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород  
Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород  
РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

Наноструктурное состояние пула растворимых дифференцировочных молекул, определяющееся составом, соотношением и взаимодействием различных белков, может оказывать на патогенез, течение и прогноз заболевания. В формировании пула участвуют также растворимая форма белка CD16 и его олигомеры, существование которых показано нами ранее. Молекула CD16 является Fc-рецептором III типа,

присутствует на мембране нейтрофилов, моноцитов, NK-клеток. Сывороточный уровень растворимых молекул CD16 в ряде случаев коррелирует с тяжестью течения и стадией онкологических заболеваний (Новиков В.В. и др., 2008).

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка сывороточного уровня суммарной и олигомерной фракций растворимой молекулы CD16 у больных раком легкого и раком тела матки.

В работе использовали образцы сыворотки крови 300 здоровых доноров, 54 больных раком лёгкого, 37 больных раком тела матки. Для выявления в сыворотке крови растворимых молекул CD16 использовали иммуноферментный сэндвич-метод с применением моноклональных антител ИКО-116 и поликлональных антител против антигенов мононуклеарных клеток крови человека в разных комбинациях. Специфичность выявления оценивали в реакции нейтрализации.

Сывороточное содержание суммарной фракции растворимых молекул CD16 у больных раком лёгкого было выше нормальных значений в 1,3 раза. Содержание олигомерной фракции растворимых молекул CD16 не менялось. Выявленный характер изменений в содержании разных фракций растворимых молекул CD16 свидетельствует о том, что подъем в содержании суммарной фракции тестированного белка происходит за счет его мономерной формы.

При раке тела матки сывороточное содержание как суммарной, так и олигомерной фракции растворимых молекул CD16 оставалось в пределах нормальных значений.

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».*

*А.В. Бабич, И.В. Быков, В.Ю. Науменко, А.А. Миронова*

#### **ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК**

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

**Задачи исследования.** На современном этапе развития методов клинической диагностики одной из актуальных задач является повышение чувствительности и разрешающей способности этих методов, которые достигаются при использовании наночастиц. По сравнению с традиционными органическими красителями такие наночастицы обладают уникальными оптическими свойствами, так как их коэффициент молекулярной экстинкции в 10–50 раз выше, чем у органических красителей. Более того, используемые красители для фотодинамической терапии часто бывают токсичными для клеток. Использование флуоресцентных наночастиц, по сравнению с красителями, дает некоторые преимущества при получении изображения опухоли за счет большего сдвига, а также благодаря тому, что время жизни флуоресценции наночастиц на порядок больше времени жизни красителей. В данной работе рассматриваются возможности использования наночастиц оксида железа в качестве «квантовых точек» или люминесцентных меток для клеточных структур.

**Материалы и методы.** При получении образцов клеток HeLa, конъюгированных наночастицами оксида железа, была использована стандартная методика выращивания клеточной популяции. После процесса инкубации клеток к ним добавлялся кол-

лоидный раствор наночастиц железа со средним диаметром частиц, равным 4,8 нм, и проводилось инкубирование в термостате 24 ч. С помощью люминесцентного микроскопа ЕС ЛЮМАМ-РПО11 и фотоаппарата Canon 450d были сделаны фотографии отдельных клеток HeLa, конъюгированных с наночастицами оксида железа при ультрафиолетовом освещении и обычном свете.

**Результаты.** Показано, что только при связывании данных наночастиц с клеточными структурами типа HeLa, они излучают узкую линию спектра на длине волны равной 554 нм, обладая флуоресцентными свойствами, и тем самым создают дополнительные диагностические возможности, которые могут реализоваться при гистологических исследованиях. Визуально, в отдельно выбранной единичной клетке HeLa, зафиксировано пребывание наночастиц железа как внутри клетки, так и на поверхности ее мембран с сохранением общей формы клетки.

**Выводы.** Металлические наночастицы могут использоваться в качестве контрастирующих веществ в магнитно-резонансной томографии, а также в качестве флуоресцентных меток во флуоресцентной микроскопии и флуоресцентной томографии, как и в других системах получения изображения очагов патологии на основе люминесцентного сигнала меток.

*М.С. Бобков, Т.И. Субботина*

#### ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫБОРКИ БОЛЬНЫХ РМЖ, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛУЧЕВУЮ ТЕРАПИЮ

*Тульский государственный университет, Тула*

**Цель исследования.** Клинико-эпидемиологическое описание контингента больных РМЖ, проходящих лучевую терапию в Тульском областном онкологическом диспансере.

**Задачи исследования.** Изучить и проанализировать следующие клинико-эпидемиологические показатели: место жительства больных (город / село); возраст больных; стадию заболевания (согласно отечественной классификации); наличие отдалённых метастазов; источник ионизирующего излучения, применяемый при проведении дистанционной гамма-терапии, методику лучевой терапии; вид лучевой терапии.

**Материалы и методы.** Материалом исследования служили данные клинических наблюдений за больными РМЖ, проходящими лучевую терапию в Тульском областном онкологическом диспансере в период с января по март 2011 г. Анализируемая выборка составила 46 человек.

**Результаты.** Из всех больных РМЖ, проходящих лучевую терапию в ГУЗ ТООД за отчётный период, городскими жителями являются 38 человек (82,6 % от общего количества пациентов), сельскими – 8 человек (17,4 %). Принадлежность к различным возрастным группам выглядит следующим образом: 30–39 лет – 1 человек (2,2 % от общего количества пациентов); 40–49 лет – 5 человек (10,8 %); 50–59 лет – 18 человек (39,1 %); 60–69 лет – 14 человек (30,5 %); старше 70 лет – 8 человек (17,4 %). Из всей выборки I стадия заболевания имела место у 2 человек (4,3 % от общего количества пациентов); II стадия – у 14 человек (30,5 %); III стадия – у 26 человек (56,5 %); IV стадия – у 4 человек (8,7 %). Отдалённые метастазы были обнаружены у 9 человек (19,6% от общего количества пациентов), в том числе у 2 больных с I стадией заболевания. В подавляющем большинстве случаев (38 человек, или 82,6% от общего количества пациентов) для

проведения дистанционной гамма-терапии использовался линейный ускоритель Elekta® с высокой энергией фотонов 18 МэВ и низкой энергией фотонов 6 МэВ, применялась методика классического фракционирования. Исключение составили 8 пациентов (17,4%), лучевая терапия которым проводилась с паллиативной целью методикой среднего фракционирования на кобальтовом гамма-терапевтическом аппарате Theratron®. Изучая вид лучевой терапии, было установлено, что в 1 случае (2,2 % от общего количества пациентов) гамма-терапия проводилась предоперационно; в 34 случаях (77,9 %) – в послеоперационно; и в 9 случаях (19,9%) – в виде паллиативного лечения.

**Выводы.** Подавляющее большинство обследованных пациентов являются городскими жителями. Максимальное число случаев РМЖ было выявлено в возрастном диапазоне 50–59 лет, минимальное – в диапазоне 30–39 лет. Наибольшее количество пациенток имеют II–III стадию заболевания. В большом количестве случаев выявлено наличие отдалённых метастазов. Линейный ускоритель с использованием фотонов высоких (18 МэВ) и низких (6 МэВ) энергий находит широчайшее применение в лечении больных по радикальной программе, тогда как кобальтовый гамма-терапевтический аппарат используется в основном при паллиативном лечении больных РМЖ. В большинстве случаев лучевая терапия проводилась в послеоперационном плане, однако достаточно часто и в качестве паллиативного лечения. Таким образом, сегодня высокие технологии, тесно интегрированные в повседневную деятельность врача, в том числе радиолога, должны быть направлены на помощь пациенту в его стремлении победить болезнь, а задача врача – разработать тот уникальный, сугубо персонифицированный план лечения, который позволит достигнуть оптимального результата.

*В.А. Богатырев, Л.А. Дыкман,*

*О.А. Бибикова, С.А. Староверов*

#### БИОИМИДЖИНГ РАКОВЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов*

Плазмонно-резонансные частицы (ПРЧ) благородных металлов (золота и серебра) благодаря своим уникальным оптическим и химическим свойствам представляют собой великолепный инструмент для цитологических исследований. ПРЧ могут быть использованы как средство доставки лекарственных соединений внутрь клеток и в качестве оптического зонда (биоимиджинг). В настоящее время предложено множество технологических решений, позволяющих получать плазмонно-резонансные частицы различных размеров и форм с настройкой плазмонного резонанса в видимой и ближней инфракрасной области светового спектра. Химическая инертность, способность противостоять окислению даже в ультрадисперсном (наноразмерном) состоянии делает золотые и серебряные ПРЧ малоцитотоксичными. В то же время поверхность ПРЧ может быть функционализирована биологически нейтральными или специфическими макромолекулами, придавая конъюгатам ПРЧ (маркерам) направленность взаимодействия с экзо- и эндоклеточными молекулярными компонентами. В зависимости от размера и функционализации поверхности ПРЧ могут проникать внутрь клеток за счет эндоцитоза или закрепляться на внешних структурах клеточ-

ной оболочки. Наиболее адекватным из современных методов оптической визуализации ПРЧ является, пожалуй, мультифотонная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия благодаря собственной (очень слабой) люминесценции золота и серебра. Однако, вследствие аномального плазмонно-резонансного светорассеяния, ПРЧ могут быть сравнительно легко выявлены как методами конфокальной, так и обычной световой микроскопии в режимах регистрации рассеяния (темное поле). Обсуждаются результаты изучения колокализации золотых, серебряных и золото-серебряных ПРЧ с животными клетками различными методами световой микроскопии.

*Н.А. Брусенцов<sup>1,2</sup>, В.А. Полянский<sup>2</sup>, Ю.А. Пирогов<sup>3</sup>, М.В. Гуляев<sup>3</sup>, И.С. Голубева<sup>1</sup>, А.В. Жуков<sup>2</sup>, Н.В. Анисимов<sup>3</sup>, Д.А. Тищенко<sup>3</sup>, Т.Н. Брусенцова<sup>4</sup>, М.П. Никитин<sup>4</sup>, П.И. Никитин<sup>4</sup>, М.В. Юрьев<sup>4</sup>, А.В. Иванов<sup>1</sup>*

#### БИОМЕХАНИКА РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕЙ И ИХ ТЕРАПИЯ НАНОПРЕПАРАТАМИ

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

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

<sup>3</sup>ЛМРТС МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

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

**Задачи исследования.** Известно отсроченное развитие опухолей как результат терапии первичных опухолей алкилирующими препаратами, вызывающими нарушения генома и мутации клеток. Целью исследования является биомеханика отсроченного развития опухолей, выявление метастазов на ранних стадиях развития и их терапия.

**Материалы и методы.** В процессе ферритмагнитной магнитогидродинамической термо-полихимиотерапии (ФТТ) самкам мышей C57Bl/6j с опухолями аденокарциномы молочной железы Ca 755 тонкой иглой вводили в опухоль и окружающие ткани магнитоуправляемый 30% золь (300 мкл), полученный на основе декстран-феррита (ДФ) (содержание феррита от 25,2 до 40 мг; цисплатина (ЦП) от 0,02 до 0,1 мг;  $pH=6,6$ ;  $\zeta=+15$  мВ;  $M_s=7,8$  кА/м;  $UAE=240$  Вт/г железа) и, кроме того, в метастазы и хвостовую вену мышей вводили 0,2 мл золя, содержащего 0,02 мг ЦП.

**Результаты и выводы.** Индукционный нагрев ДФ-ЦП в переменном магнитном поле приводил к полной регрессии опухолей аденокарциномы Ca 755 у 40 % мышей и к 300% увеличению продолжительности жизни при объеме исходных опухолей ~30 мм<sup>3</sup>. В эксперименте при своевременном проведении ФТТ наблюдали уменьшение объема опухоли, связанное с апоптозом. В контроле наблюдали отсроченное развитие опухолей, связанное с дальнейшими глубокими нарушениями генома опухолевых клеток. В процессе высокодозной ФТТ наблюдали полную гибель клеток с различными генетическими нарушениями и наступление длительной ремиссии. У животных с ремиссией опухолей от 90 до 200 дней выявили развитие индуцированных ЦП отдаленных инвазий и метастазов, которые явились началом вторичных солидных опухолей.

Показано что положительный эффект терапии в значительной степени зависит от правильно выбранного сочетания препаратов, своевременного введения и подобранных доз в комбинациях, останавливающих клеточный цикл в соответствующих фазах.

*Исследование поддержано Грантами РФФИ: (07-04-92001-ННС\_а; 11-01-00051; 10-01-00015; 09-04-12284, 10-02-01182).*

*И.В. Быков, А.В. Семейкин, Н.Л. Шимановский, А.Г. Аюнджанов, В.Ю. Науменко*  
**ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЛОЖНОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (МАГНЕТИТА), ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ КОНТРАСТИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ, С ПРИГОДНОЙ БИОСОВМЕСТИМОСТЬЮ**  
 Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

**Задачи исследования.** Наночастицы магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (FeO×Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) представляют интерес в качестве основы для создания магнитно-резонансного контрастного средства при МРТ-диагностике опухолевых заболеваний. Использование наночастиц в биомедицине и фармакологии предполагает выполнения ряда требований: наночастицы должны образовывать устойчивую коллоидную систему, удовлетворять требованиям биосовместимости и иметь фиксированное значение рН. Наночастицы в водных растворах и других биологических средах имеют склонность к агрегации, поэтому практическое использование растворов магнетита сопряжено с их стабилизацией добавлением специальных поверхностно-активных веществ (ПАВ). В задачи исследования входило изучение биосовместимости полученных наночастиц оксида железа в зависимости от их состава.

**Материалы и методы.** Наночастицы магнетита были получены с помощью реакции Элмора, она достаточно проста и технологична. В качестве ПАВ использовали лимонную кислоту, которая не обладает сильными поверхностно активными свойствами, но приемлема с биологической точки зрения и цитрат натрия. Токсичность наночастиц определяли на культуре клеток HeLa (эпителиоидный рак шейки матки человека) при времени инкубации 24 ч и с помощью МТТ-теста по методике, утвержденной для доклинических испытаний лекарственных препаратов. Использовались наночастицы с разными физическими параметрами.

**Результаты.** Исследование показало, что раствор наночастиц с оптимальными магнитными свойствами обладает высокой токсичностью. Снижение концентрации ПАВов, приводило к её росту, из чего следует, что явление вызвано малым размером частиц, а не остатками продуктов химической реакции (см. таблицу). Обработка результатов проводилась с помощью метода Стьюдента-Госсета, с достоверным отличием  $p \leq 0,05$ . Снижение токсичности достигалось увеличением оболочки наночастиц из цитрата натрия. В результате была снижена цитотоксичность предлагаемого средства при незначительном ухудшении магнитных свойств и выбрана оптимальная концентрация ПАВа, которая составила 60 г/л.

Т а б л и ц а  
 Зависимость жизнеспособности культуры клеток от концентрации цитрата Na при времени инкубации 24 ч

Концентрация цитрата натрия	Концентрация наночастиц магнетита		
	0,5 г/л	0,1 г/л	0,05 г/л
0 г/л	52,01%±16,14%	86,50%±19,53%	87,20%±11,28%
11 г/л	58,51%±20,86%	68,55%±25,51%	94,41%±14,89%
44 г/л	66,57%±29,99%	102,89%±12,98%	83,11%±22,22%
60 г/л	85,08%±13,87%	98,94%±16,64%	98,23%±19,72%
82 г/л	90,17%±15,79%	110,95%±8,46%	97,24%±4,36%

**Выводы.** Подобраны нужные концентрации лимонной кислоты и цитрата натрия для получения биосовместимых наночастиц оксида железа, предназначенных для контрастирования опухолевых заболеваний при проведении МРТ.

П.М. Бычковский<sup>1</sup>, А.А. Кладиев<sup>2</sup>,  
С.Ю. Щеголев<sup>3</sup>, В.А. Богатырев<sup>3</sup>, Т.Л. Юркинович<sup>1</sup>,  
Ф.Н. Капуцкий<sup>1</sup>, С.А. Беляев<sup>1</sup>, С.О. Соломевич<sup>1</sup>,  
С.А. Красный<sup>4</sup>, Ю.П. Истомин<sup>4</sup>, Е.Н. Александрова<sup>4</sup>

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА  
КАК КОРПУСКУЛЯРНОЙ МАТРИЦЫ  
ДЛЯ ДОСТАВКИ  
ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

<sup>1</sup> Учреждение БГУ «НИИ физико-химических проблем», Минск

<sup>2</sup> ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва

<sup>3</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

<sup>4</sup> ГУ «РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова», Минск

**Задачи исследования.** Получение лекарственных форм противоопухолевых препаратов проспирина и цисплатина с использованием наночастиц золота в качестве носителя и исследование их противоопухолевой активности *in vitro*.

**Материалы и методы.** Водные растворы коллоидного золота (КЗ) со средним диаметром частиц 25 нм, стабилизированные полиэтиленгликолем, и фармакопейные субстанции цис-диаминдихлорплатина (П) и проспирина хлорид. Исследование процесса иммобилизации проспирина и цисплатина КЗ проводили методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, электронной микроскопии, центрифугирования, а также химическими методами анализа. Оценка противоопухолевой активности полученной лекарственной формы проспирина и цисплатина была проведена *in vitro* на культуре опухолевых клеток HeLa. Для оценки цитостатического и цитотоксического эффектов препаратов количество выживших клеток сравнивали с числом клеток в контроле с исходным числом клеток до воздействия.

**Результаты и выводы.** Сорбцию цисплатина и проспирина коллоидным золотом проводили из их водных растворов с концентрациями  $8,3 \times 10^{-5} \div 3,3 \times 10^{-3}$  и  $1,0 \times 10^{-1} \div 4,0 \times 10^{-1}$  ммоль/мл соответственно при  $T = 293 \pm 1$  К. Показано, что максимальное количество иммобилизованного проспирина составляет 0,36 моль на 1 г используемого раствора коллоидного золота (в пересчете на золото). Максимальное содержание цисплатина в фазе КЗ составляет 36,3 ммоль/г при его концентрации в исходном растворе  $3,30 \times 10^{-3}$  ммоль/мл. Противоопухолевая активность проспирина, иммобилизованного на КЗ, практически соответствует активности водного раствора проспирина при значительном уменьшении его содержания. Противоопухолевая активность цисплатина, иммобилизованного на КЗ, оказалась ниже, чем в случае его водного раствора. Результаты данных исследований могут быть использованы для создания новой эффективной лекарственной формы нанонкологических препаратов на основе коллоидного золота с цисплатином и проспирином.

Ю.А. Геворкян, Е.М. Франциянц, С.А. Ильченко,  
Н.В. Солдаткина, А.В. Даишков

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ  
В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ  
РЕЗЕКТАБЕЛЬНЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА**

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России, Ростов-на-Дону

**Задачи исследования.** Улучшить результаты лечения больных резектабельным раком желудка путем применения направленной доставки химиопрепаратов через левую желудочную артерию с ис-

пользованием модуляторов (озонированные среды) во время операции гастрэктомии.

**Материалы и методы.** Проанализированы данные о 30 больных раком желудка T<sub>3-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub>. 6 (20 %) больных находились в возрасте до 50 лет. Морфологически у 20 (66,6 %) больных была установлена аденокарцинома. 15 больным (основная группа) проведено комплексное лечение, включающее гастрэктомию и интраоперационную регионарную химиотерапию с озонированными средами. 15 больным (контрольная группа) во время операции гастрэктомии проводили внутривенную химиотерапию без озонированных сред. Для проведения регионарной химиотерапии с озонированными средами вводили интраоперационно внутривенно 100 мл озонированной аутокрови (400 мкг/л), в последующем с интервалом 5 мин вводили лейковорин в дозе 100 мг/м<sup>2</sup> и 5-фторурацил в дозе 13,5 мг/кг, а в левую желудочную артерию 50 мл озонированного физиологического раствора (1000 мкг/л), в последующем с интервалом 5 мин вводили оксалиплатин в дозе 85 мг/м<sup>2</sup>. После 30-минутной экспозиции химиопрепарата в пораженном органе выполняли гастрэктомию. В контрольной группе больным во время операции гастрэктомии вводили внутривенно те же дозы химиопрепаратов.

**Результаты.** Комплексное лечение больных резектабельным раком желудка с применением химиотерапии с озонированными средами достоверно улучшает клиническое течение послеоперационного периода, достоверно снижает частоту возникновения послеоперационных осложнений на 29,6%, благоприятно влияет на свертывающую систему крови и уменьшает вероятность развития гиперкоагуляции. За время наблюдения (до 12 месяцев) у больных основной группы не выявлено ни одного случая прогрессирования заболевания. В контрольной группе у 3 больных (20 %) выявлены отдаленные метастазы.

**Выводы.** Применение направленной доставки химиопрепаратов через левую желудочную артерию с использованием модуляторов (озонированные среды) во время операции гастрэктомии достоверно улучшает результаты лечения больных резектабельным раком желудка.

Ю.А. Геворкян, Ф.Н. Гречкин, В.Е. Колесников,  
Н.В. Солдаткина, А.В. Даишков

**НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА  
ХИМИОПРЕПАРАТОВ  
В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ МЕТАСТАЗОВ  
В ПЕЧЕНЬ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ**

ФГУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России, Ростов-на-Дону

**Задачи исследования.** Улучшить результаты лечения больных с метастазами в печень рака толстой кишки путем применения направленной доставки химиопрепаратов, включающей внутритканевую химиотерапию на аутоплазме.

**Материалы и методы.** Проанализированы данные 35 больных с нерезектабельным метастатическим поражением печени, ранее леченных комплексным методом по поводу рака толстой кишки в возрасте от 32 до 71 года. 15 больным (основная группа) проведена чрескожная радиочастотная термоабляция (РЧА) с внутритканевой химиотерапией на аутоплазме. 20 больным (контрольная группа) проведена только стандартная многокурсовая химиотерапия по схеме FOLFOX. Для проведения РЧА с внутритканевой химиотерапией больным

выполняли чрескожную радиочастотную термоабляцию метастазов в печень по стандартной методике под ультразвуковым контролем, после завершения которой через инфузионный насос в электрохирургическом устройстве в ложе подвергнувшегося термодеструкции метастаза вводили инкубированную аутоплазму с 5-фторурацилом (500 мг на каждый метастаз). Затем больные получили многокурсовую химиотерапию по схеме FOLFFOX.

**Результаты.** Для контроля эффективности лечения больным выполняли в динамике УЗИ-исследование, СКТ. За весь период наблюдения (10 мес.) у 1 (7 %) большого основной группы и у 8 (40 %) больных контрольной группы выявлено прогрессирование метастатического поражения печени ( $p < 0,05$ ).

**Вывод.** Применение направленной доставки химиопрепаратов, включающей внутритканевую химиотерапию на аутоплазме в комплексе с РЧТА нерезектабельных метастазов в печень, способствует улучшению результатов лечения рака толстой кишки с метастазами в печень.

*В.С. Гринёв, А.Ю. Егорова,  
Г.С. Терентюк, Е.Е. Фёдоров*

#### **КОМПЛЕКСЫ ПАЛЛАДИЯ С АЗОПОЛИГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ.**

#### **СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ**

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов*

В настоящее время ведутся активные поиски веществ, близких по структуре к применяемым противоопухолевым препаратам на основе комплексов платиновых металлов (в частности, цисплатину, карбоплатину и др.); активно изучаются закономерности структура-свойство; предлагаются новые подходы к решению известных проблем современных препаратов. Применение цисплатина ограничивается относительно небольшим диапазоном опухолей, на которые он может успешно воздействовать. Нами была проведена функционализация полигетероциклических соединений на основе легкодоступных исходных веществ с помощью реакций азосочетания с солями диазония различных ароматических аминов, в том числе и гетероциклического строения. Полученные арилазосоединения обладают свойствами лигандов в реакциях комплексообразования, а соответствующие комплексы металлов платиновой группы, исходя из результатов виртуального скрининга с помощью программы PASS, предположительно, должны обладать высокой противоопухолевой активностью (вероятность до 75 %). Поскольку растворимость полученных комплексов в воде невысока, была предложена инъекционная форма на основе фармакопийно разрешённых органических растворителей (ДМСО, ДМФА) и ПАВ, позволяющая получать препарат в мицеллярной форме с концентрацией активного вещества 1 мг/мл. Проведённые предварительные эксперименты с животными по выявлению острой токсичности синтезированных комплексов палладия показали, что предложенная композиция, состоящая из органических растворителей и ПАВ, не является токсичной, а растворимость комплексов в инъекционной форме недостаточна для введения дозы препарата, описанной в литературе, в пересчёте на массу животного. Также, возможно, большой объём молекулы комплекса и то, что в инъекционной форме он находится в мицеллярной форме, затрудняет

мицеллам проникновение через клеточные мембраны. В качестве дальнейшего направления был выбран синтез более компактных молекул азосоединений, а также повышение растворимости получаемых комплексов.

*Л.А. Дыкман, С.А. Староверов, В.А. Богатырев,  
Н.Г. Хлебцов, С.Ю. Щёголев*

#### **ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ХИМИОТЕРАПИИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ**

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов*

Первые сведения о коллоидном золоте можно найти в трактатах китайских, арабских и индийских ученых, которые уже в V–IV веках до нашей эры получали коллоидное золото и использовали его в лечебных целях. В онкологической практике с 1927 г. коллоидное золото было предложено использовать для облегчения страданий неоперабельных раковых больных. Коллоидные растворы изотопа золота  $^{198}\text{Au}$  успешно использовались в онкотерапии с пятидесятью летями прошлого века. В последние годы золотые наночастицы (ЗНЧ) различных размеров и форм предложено применять в диагностике, лечении и профилактике заболеваний. В частности, ЗНЧ активно используют для идентификации, визуализации и биоимиджинга раковых клеток методами электронной просвечивающей и сканирующей микроскопии, атомно-силовой микроскопии, конфокальной лазерной микроскопии, микроскопии темного поля. Кроме перечисленных способов регистрации биоспецифических взаимодействий с помощью различных вариантов оптической микроскопии и ЗНЧ, в настоящее время активно развиваются и другие современные методы детекции и биоимиджинга, которые можно объединить под общим названием «методы биофотоники». К методам биофотоники можно отнести оптическую когерентную томографию, рентгеновскую и магнито-резонансную томографию, фотоакустическую микроскопию и томографию, флуоресцентную корреляционную микроскопию и т.п. Конъюгаты ЗНЧ нашли многочисленные применения в аналитических исследованиях, которые могут быть основаны как на современных инструментальных методах (SERS, SEIRA, LISNA и т.д.), так и на простых твердофазных или гомофазных методиках (дот-анализ, иммунохроматография и т.п.). Плазменная фототермическая лазерная терапия рака с помощью ЗНЧ, впервые описанная в 2003 г., в настоящее время перешла в стадию клинической апробации. Одним из наиболее перспективных и активно развивающихся аспектов использования ЗНЧ в медицине является адресная доставка лекарственных средств. Самыми популярными объектами для адресной доставки являются противоопухолевые препараты. Лекарственный препарат для внутривенного введения на основе конъюгата ЗНЧ с фактором некроза опухолей под названием AurImmune<sup>TM</sup> уже прошел вторую стадию клинических испытаний. Обнаружение адьювантных свойств у ЗНЧ создает благоприятные условия для разработки нового поколения вакцин, в том числе и антираковых.

*О.Ф. Евстратова, Л.Х. Гаркави, Г.В. Жукова,  
Т.А. Бартенева, А.И. Михолап, Е.А. Ширнина*  
**МЕСТНЫЕ И СИСТЕМНЫЕ ЭФФЕКТЫ  
НАНОЧАСТИЧ-ФЕРРИМАГНЕТИКОВ  
У ЖИВОТНЫХ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ**  
*ФГУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России, Ростов-на-Дону*

Изменение параметров эндогенных электромагнитных излучений при росте злокачественных опухолей, а также важная роль железа и его соединений в обеспечении систем регуляции жизнедеятельности клеток позволили предположить возможность противоопухолевого влияния этих факторов при их самостоятельном использовании. Задача исследования – изучение влияния магнитной жидкости АМ-01 (МЖ), применяемой в качестве монофактора или в комбинации с низкоинтенсивным инфранизкочастотным магнитным полем (ИНЧ МП), на изменения в ткани перевивной саркомы 45 и органах иммунной системы белых беспородных крыс-самцов (30). МЖ (в дозе более 100 мг/кг) вводили подкожно на расстоянии 2–3 см от опухоли, воздействие ИНЧ МП (20 мТл, 7,8 Гц, 15 мин, аппарат «Градиент-3») осуществляли на область опухоли с захватом зоны введения МЖ. Микрорентгенография опухоли, тимуса и селезенки изучалась с помощью гистохимического метода Браше, использовали морфометрический анализ. Противоопухолевый эффект наблюдали более чем у 50% животных при использовании только МЖ или МЖ в комбинации с ИНЧ МП. У крыс контрольной группы отмечен рост опухоли, в ткани которой наблюдались высокая плотность расположения опухолевых клеток и многочисленные фигуры митоза (7–8 в поле зрения), часто с признаками атипии. Более чем у 33 % животных после воздействия исследованных факторов наблюдали регрессию саркомы 45 с замещением ткани опухоли соединительной тканью, обильно инфильтрированной лимфоцитами, плазмочитами, макрофагами. При этом выявлены четкие признаки повышения функциональной активности органов иммунной системы ( $p < 0,05$ ). Так, в тимусе увеличивались размеры долек, площадь коркового вещества (в 3 и более раз), значительно повышалась плотность лимфоцитарной популяции. В селезенке увеличивались число и размеры фолликулов, площадь герминативных центров, в которых была отмечена высокая митотическая активность (до 8–10 фигур митоза в поле зрения). Об активации межклеточных взаимодействий в органах иммунной системы свидетельствовало увеличение контактов тканевых базофилов с тимоцитами ( $p < 0,05$ ), а также заметное повышение (до 6–7 в поле зрения,  $p < 0,05$ ) числа розеткоподобных комплексов из макрофагов и спленоцитов в красной пульпе селезенки.

*Н.С. Егоров*

#### **БУДУЩЕЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ТЕХНОЛОГИИ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

*ООО ИнтерЛабСервис, Москва*

Несмотря на значительные успехи в области здравоохранения в последнее время, онкологические заболевания являются одной из основных причин смерти во всем мире. Рак развивается из одной единственной клетки и его развитие может быть инициировано как внешними, так и наследственными генетическими факторами. Шансы выздоровления у онкологических больных значительно возрастают в случае ранней диагностики злокачественных образований, а так же в случае правильного подбора терапии, которая нередко определяется генетическими факторами организма, такими как однонуклеотидные полиморфизмы и абберации. Секвенирование всего генома является одним из способов изучения онкологических заболеваний.

Это самый мощный диагностический инструмент, который позволяет определять все мутации в геноме больного раком. В настоящее время секвенирование нового поколения методом синтеза является одной из самых быстроразвивающихся технологий в мире. В результате научных исследований по данной технологии выходит множество научных статей, посвященных диагностике и терапии рака. В 2004 г. закончился 1-й Геномный проект, который длился 15 лет. Его целью было определение полной нуклеотидной последовательности генома человека. На его реализацию были потрачены колоссальные средства. За один день работы сотня капиллярных секвенаторов могла получать не более 200 мб общей ёмкости данных. Современный секвенатор нового поколения компании Иллюмина HiSeq2000 за один сеанс запуска способен одновременно определить первичную структуру ДНК пяти человеческих геномов с 30-кратным покрытием каждый, что соответствует 600 Гб информации. Весь эксперимент длится всего 8–10 дней и предоставляет исследователю данные с точностью 99,99 %. Персональная система для полногеномного секвенирования MiSeq является самой уникальной разработкой компании Иллюмина. Эта экономичная система занимает минимальное место в лаборатории и способна осуществлять полногеномное секвенирование с обработкой результатов всего за 8 ч. Линейка секвенаторов компании Иллюмина подходит для любых исследований, связанных с секвенированием *de novo*, с более узконаправленным ресеквенированием, метагеномными исследованиями, а так же для изучения экспрессии генов и белок-белковых взаимодействий. Данные приборы могут быть эффективно использованы как для научных, так и для диагностических целей.

*В.В. Елагин<sup>1,2</sup>, А.А. Брилкина<sup>1</sup>, Е.А. Сергеева<sup>3</sup>,  
В.А. Надточенко<sup>4</sup>, Е.В. Загайнова<sup>2</sup>*

#### **ВОЗДЕЙСТВИЕ ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ**

<sup>1</sup>*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород*

<sup>2</sup>*Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород*

<sup>3</sup>*ИИФ РАН, Н. Новгород*

<sup>4</sup>*Институт химической физики РАН, Москва*

Плазмонно-резонансные золотые наночастицы обладают уникальными оптическими свойствами и могут быть использованы в медицине как для диагностики, так и для терапии патологических состояний. В рамках данного исследования решалось несколько задач. Во-первых, изучались особенности взаимодействия золотых наночастиц, покрытых ПЭГ с различной молекулярной массой, с раковыми клетками. Во-вторых, оценивалась эффективность проведения лазерного воздействия на раковые клетки в присутствии золотых наночастиц.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на клетках линии SKOV-3. В работе использовали золотые наночастицы в форме стержней, покрытые ПЭГ с молекулярной массой 6000Да и 40000Да. Взаимодействие наночастиц с клетками исследовали методом многофотонной флуоресцентной микроскопии. Лазерное воздействие осуществляли в непрерывном режиме с выходной мощностью от 0,5 до 3 Вт и длительностью 10 мин. Оценку жизнеспособности клеток после воздействия проводили методом МТТ-теста.

**Результаты.** Методом многофотонной флуоресцентной микроскопии было выявлено, что наночастицы, покрытые ПЭГ 6000 Да, проникали в клетки, тогда как частицы, покрытые ПЭГ 40000 Да, обнаруживались на внешней стороне мембраны. При проведении лазерного воздействия на клетки, содержащие наночастицы, отмечалась гибель 33 % клеток уже при 0,5 Вт. По мере увеличения мощности гибель клеток увеличивалась и достигала 89 % при 3 Вт. Воздействие на клетки, не содержащие наночастицы, сопровождалось гибелью 64 % и 72 % только при мощностях 2,5 и 3 Вт.

**Выводы.** В ходе исследования было установлено, что на способность наночастиц проникать в клетки влияет тип покрытия. Также показано, что наночастицы могут быть использованы в качестве термосенсибилизаторов при проведении лазерной гипертермии.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК №№ 02.740.11.0713, 14.740.11.1188, договор № 11.G34.31.0017), РФФИ (проект № 09-02-00539).*

*К.В. Ермакова<sup>1</sup>, З.С. Смирнова<sup>1</sup>, И.Ю. Кубасова<sup>1</sup>, Л.М. Борисова<sup>1</sup>, М.П. Киселева<sup>1</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1</sup>, О.Л. Орлова<sup>1</sup>, А.П. Полозкова<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, Г.А. Меерович<sup>2</sup>*

#### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛФ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ТИОСЕНС ПРИ ФДТ ОЛИГОДЕНДРОГЛИОМЫ 14-4-9**

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

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

Существенным недостатком традиционных методов лечения глиом является их низкая эффективность. Средняя продолжительность жизни больных с глиомами после хирургического удаления опухоли, лучевой и химиотерапии не превышает года. В мировой литературе имеются данные об эффективности ФДТ с использованием различных фотосенсибилизаторов при комбинированном лечении злокачественных глиом. С целью повышения уровня накопления фотосенсибилизатора в ткани мозга используют различные системы доставки, в том числе и липосомы.

**Цель исследования.** Оценка эффективности ФДТ с лиофилизированной липосомальной лекарственной формой отечественного фотосенсибилизатора Тиосенс (Тиосенс-ЛИО) в монотерапии и при комбинированном лечении олигодендроглиомы 14-4-9 (ОДГ).

**Материалы и методы.** ОДГ перевивали интракраниально крысам по 1,5 млн. опухолевых клеток. Тиосенс-ЛИО с максимумом поглощения в спектральном диапазоне 720 нм вводили внутривенно в дозе 3 мг/кг на 6 день опыта за 24 ч до проведения ФДТ. Лазерное облучение проводили в дозе 90 Дж/см<sup>2</sup>. Лизомустин вводили однократно в дозе 80 мг/кг. Критериями эффективности служили увеличение продолжительности жизни опытных крыс по сравнению с контрольными животными (УПЖ, %) и излечение.

**Результаты.** Установлено, что терапевтическая эффективность ФДТ с использованием Тиосенса-ЛИО при интерстициальном лазерном облучении через трепанационное отверстие составляет 30 % УПЖ. При дополнительной декомпрессионной краниотомии (4×5 мм) и поверхностном лазерном облучении эффективность ФДТ с Тиосенсом не увеличилась, и УПЖ составило 29 %.

Наибольшая эффективность наблюдалась при комбинированном лечении с использованием декомпрессионной краниотомии, ФДТ с Тиосенсом-ЛИО и химиотерапии с Лизомустинном. У 43 % крыс отмечалась стойкая ремиссия в течение 6 мес. и отсутствие признаков роста опухоли при аутопсии, что расценивалось как излечение. УПЖ оставшихся 57 % крыс составило 80 %.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности ФДТ с Тиосенсом-ЛИО при комбинированном лечении олигодендроглиомы.

*Г.В. Жукова, Т.Н. Гудицова, М.И. Брагина, Н.М. Мащенко*

#### **ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ОПОСРЕДОВАННОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ-ФЕРРИМАГНЕТИКОВ И МИКРОВОЛНОВОГО РЕЗОНАНСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*ФГУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России, Ростов-на-Дону*

В эксперименте на 73 белых беспородных крысах изучали изменения в ткани перевивной саркомы 45 при опосредованных противоопухолевых эффектах двух различных факторов – микроволнового резонансного излучения (РИ) и наночастиц-ферритмагнетиков (магнитной жидкости). Воздействие низкоинтенсивным (менее 10 мкВт/см<sup>2</sup>) РИ, имеющим частоту, совпадающую с частотой собственного излучения молекулярных кластеров воды (Синицын Н.И., Петросян В.И., Ёлкин В.А. и др., 2002), осуществлялось на голову животного, помещенного в плексигласовую камеру, в течение 3,5 недель. Экспозицию изменяли в течение курса в соответствии с алгоритмами активационной терапии (Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., 1990; Гаркави Л.Х., 2006). Магнитную жидкость АМ-01 на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (МЖ) вводили в разных дозах (более 100 мг/кг) подкожно на расстоянии 2–3 см от опухоли 5–6 раз в течение 3 недель. Ультратонкие срезы изучали и фотографировали на электронном микроскопе JEOL JEM-1011. Оба исследованные воздействия оказывали противоопухолевый эффект не менее, чем у 50 % животных в виде регрессии или выраженного торможения роста опухоли (более чем на 70 %). При этом результаты электронно-микроскопического исследования свидетельствовали о сходном влиянии исследованных воздействий на ультраструктурные характеристики некоторых клеток опухоли, повышении степени их дифференцировки, а также об активации взаимодействий между клетками иммунной системы и клетками опухоли при действии РИ или МЖ. Это выражалось в расширении межклеточных пространств и заполнении их коллагеном, увеличении объема цитоплазмы, восстановлении характерной структуры эндоплазматического ретикулума, в котором были отмечены протофибриллы коллагена. Были отмечены немногочисленные клетки с признаками апоптоза (маргинация хроматина, фрагментация клетки с образованием апоптотных телец). Контакты клеток иммунной системы с клетками опухоли и друг с другом были весьма многочисленны и носили множественный точечный характер. В зонах контакта в лейкоцитах наблюдалось образование цитоплазматических выростов и признаки активации синтетических процессов. Меж-

клеточное пространство в зоне контактов макрофагов и клеток опухоли было заполнено электронноплотным содержимым. Отличительной особенностью действия МЖ явилось заметное количество нейтрофилов среди клеток иммунной системы, инфильтрирующих ткань опухоли.

*Е.Ю. Златник, Г.И. Загора, Л.В. Передереева*

#### **НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛОВ КАК НОВЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВЕЩЕСТВА**

*ФГУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России, Ростов-на-Дону*

Синтез и исследование биотропных свойств наночастиц различных веществ являются важнейшими инновационными разработками. Цель исследования – изучить возможные антипролиферативные эффекты НЧ. НЧ представляют собой ультрадисперсные порошки металлов (Cu, Zn, Fe и их сплава; размер 30–100 нм), синтезированные на Саратовском плазмохимическом комплексе ФГУП РФ ГНЦ ГНИИХТЭОС.

Опыты проводили на культурах опухолевых клеток (K562, HeLa, X563), на ксенографтах опухолей больных, в эксперименте на перевиваемых опухолях (С37 и С180 мышей, С45 крыс).

Результаты показали, что при инкубации в присутствии НЧ усиливается как апоптотическая, так и некротическая гибель клеток культур. Показано выраженное угнетение их пролиферации и разрушение с явлениями вакуолизации ядра и цитоплазмы, кариопикноза, кариорексиса, кариолизиса. Клетки ксенографтов опухолей (рак легкого) также разрушаются под действием НЧ металлов, более интенсивно при инкубации с НЧCu и НЧZn, чем с НЧFe. Интересно, что при аналогичном культивировании ксенографтов тимуса мышей с НЧ наибольшее повреждающее действие отмечено у НЧFe. При изучении влияния НЧ на рост опухолей *in vivo* их взвесь вводили в область опухоли. В случае асцитной опухоли С37 после введения НЧ установлено резкое подавление накопления асцитической жидкости и снижение количества в ней живых опухолевых клеток.

Гистологическое исследование выявило обширные поля жировой дистрофии и некроза в опухолевой ткани после введения НЧCu и НЧZn в отличие от действия НЧFe, которые вызывали незначительный эффект. На модели солидной опухоли С180 показано, что введение НЧ способствует полной регрессии опухоли, наиболее быстро развивающейся при введении НЧ сплава и приводящей к существенному (3–4-кратному) повышению продолжительности жизни мышей. На модели С45 крыс продемонстрировано, что пролиферативный потенциал опухоли полностью угнетается при инкубации перевивного материала с НЧ сплава металлов.

Итак, нами установлено выраженное противоопухолевое действие НЧ металлов, реализующееся при локальном введении, причем НЧ Cu, Zn и сплава более активны, чем НЧ Fe. При системном введении мышам без опухолей показано отсутствие выраженного токсического действия исследованных НЧ на органы кроветворения и иммуногенеза. Таким образом, НЧ металлов, в частности Cu, Zn и сплава, могут стать основой для получения нового класса противоопухолевых веществ.

*Авторы приносят благодарность профессору Саратовского медуниверситета В.Б. Бородулину за предоставление НЧ.*

*А.В. Иванов<sup>1</sup>, А.Б. Соловьева<sup>2</sup>, Н.С. Мелик-Нубаров<sup>3</sup>, П.И. Толстых<sup>4</sup>, М.В. Уткина<sup>1</sup>*

#### **РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ С ПОРФИРИНОВЫМИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ ДЛЯ ФДТ ПОВЕРХНОСТНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ, ГНОЙНЫХ РАН И ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ**

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

*<sup>2</sup>ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН, Москва*

*<sup>3</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

*<sup>4</sup>ФГУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА», Москва*

В настоящее время ФДТ применяют не только при лечении новообразований, но и для лечения гнойных, долго незаживающих ран и трофических язв. Важным преимуществом ФДТ при лечении инфицированных ран является возможность воздействия на устойчивые к действию антибиотиков штаммы бактерий. Нами было обнаружено, что локальное использование фотосенсибилизаторов (ФС), иммобилизованных на некоторых типах амфифильных полимеров (АП) позволяет значительно увеличивать эффективность ФДТ. Методами атомно-силовой микроскопии и динамического рассеяния света установлено, что полученные модели лекарственных форм представляют наноразмерные комплексы, размерами от 10 до 200 нм, зависящими от природы составляющих компонентов. Предложен механизм влияния полимеров на фотодинамическую эффективность ФС.

Проведены эксперименты *in vitro* на клеточных культурах и *in vivo* на лабораторных животных и показано, что комплексы ФС-АП в десять и более раз активнее исходных порфиринов, что позволяет снизить терапевтические дозы используемых ФС. При этом наблюдалось уменьшение количества отдаленных метастазов у лабораторных животных при воздействии на поверхностные опухоли. Показано, что эффективность комплексов при воздействии на опухоли разной природы определяется в первую очередь природой полимера. Созданы макеты лекарственных форм в виде пленок, гелей, спреев. Проведенные пилотные клинические испытания показали высокую эффективность созданных композиций в лечении долго незаживающих ран и ожогов. Предложен высокоэффективный способ лечения гнойных заболеваний мягких тканей, который позволяет предотвращать развитие вторичных некрозов и рост остаточной микрофлоры, обеспечивает стимулирование репаративных процессов и сокращает в 1,5 – 2 раза сроки лечения обширных гнойных ран. Совершенно очевидно, что предлагаемые лекарственные формы ФС найдут также применение при лечении воспалительных, эрозивных и неопластических процессов слизистой оболочки тканей в гинекологии, оториноларингологии и стоматологии, где достаточно широко применяются препараты в виде мазей, гелей и спреев.

*Е.В. Игнатьева, Н.А. Машалова,*

*Е.В. Санарова, И.В. Ярцева*

#### **МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕЦИТИНА В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ ТИОСЕНСА**

*РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

Тиосенс – комплексное соединение алюминия из класса тиофталоцианинов – получено в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» и предназначено для фотодинамиче-

ской терапии опухолей. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН проводятся исследования по разработке лиофилизированной липосомальной лекарственной формы Тиосенса (ЛЛФТ-лио), представляющей собой многокомпонентную композицию, основой которой является яичный лецитин EPSCS (Lipoid).

**Цель исследования.** Модификация методики количественного определения лецитина.

**Материалы и методы.** Образцы модели ЛЛФТ-лио; спектрофотометрия.

**Результаты и выводы.** Для количественного определения лецитина, самого значительного по массе компонента в ЛЛФТ-лио, предложена спектрофотометрическая методика, основанная на способности фосфолипидов образовывать хорошо растворимые в хлороформе окрашенные комплексы с аммоний ферротрицианатом. Максимум поглощения комплекса, полученного с яичным лецитином EPSCS (Lipoid), регистрируется при 475 нм. Показано, что ингредиенты ЛЛФТ-лио, включая тиосенс, не оказывают существенного влияния на образование и спектральные характеристики комплекса лецитина с аммоний ферротрицианатом, а также то, что в диапазоне концентраций лецитина от 0,005 до 0,05 мг/мл соблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации лецитина в растворе. Для определения содержания лецитина в единице лекарственной формы используют калибровочный график. Поскольку в процессе разработки ЛЛФТ-лио был выбран состав лекарственной формы с содержанием лецитина 300 мг во флаконе, для упрощения методики и сокращения времени ее выполнения предложено проводить определение с использованием рабочего стандартного образца (PCO) лецитина. Данный вариант методики обладает достаточной точностью и воспроизводимостью. Относительная ошибка определения не превышает 2,0 %.

*Работа поддержана Правительством г. Москвы.*

*А.В. Калугин<sup>1</sup>, Д.В. Новиков<sup>1</sup>, Е.Ю. Контрощикова<sup>2</sup>, М.Е. Мамаева<sup>3</sup>, В.В. Новиков<sup>1</sup>*

#### **ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ мРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ ГЕНОВ ОТ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ**

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

<sup>3</sup>ФГУ Приволжский окружной медицинский центр ФМБА, Нижний Новгород

**Задачи исследования.** Биологические чипы являются мощным инструментом изучения генома опухолевой клетки с целью выяснения «молекулярного портрета» опухоли. Среди широкого репертуара опухолеассоциированных генов выделяется группа РТ генов. Целью данной работы явилось сравнение частоты встречаемости мРНК РТ генов со степенью дифференциации аденокарциномы эндометрия.

**Материалы и методы.** С помощью ОТ-ПЦР было исследовано 33 образца периферической крови и 25 образцов опухолевых очагов больных с гистологически подтвержденным диагнозом аденокарциномы эндометрия I стадии.

**Результаты и выводы.** При сравнении частоты встречаемости мРНК генов MAGE A(1-6), XAGE1, MAGEC1, NY-ESO-1 и GAGE1-9 в солидных опухолях рака эндометрия с различной степенью дифференциации различий не обнаружено. В перифе-

рической крови при низкодифференцированной карциноме мРНК MAGE A(1-6) (50 %) и XAGE1 (50 %) выявлялись в 2 и в 4 раза чаще, чем при умеренно дифференцированной карциноме (22 % – MAGEA и 11 % – XAGE), и в 1,5 и 2 раза чаще, чем при высокодифференцированной карциноме (39 % – MAGEA и 22 % – XAGE). При низкодифференцированной карциноме мРНК NY-ESO-1 (16 %) встречались в 1,5 раза чаще, чем при умеренно дифференцированной карциноме (11 %), и в 3 раза чаще, чем при высокодифференцированной карциноме (5 %). Матричная РНК GAGE1-9 встречалась только в периферической крови при высокодифференцированной (16 %) и умеренно дифференцированной (11 %) карциноме, а мРНК MAGEC1 – только в крови при высокодифференцированной (22 %) и низкодифференцированной (16 %) карциноме. Таким образом, показана зависимость частоты встречаемости мРНК РТ генов в периферической крови больных раком эндометрия от степени дифференциации аденокарциномы.

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

*А.П. Каплун, А.С. Журавко, В.И. Швец*

#### **ДОСТАВКА МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**

*МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Малые интерферирующие РНК (миРНК, siRNA) принимают участие в процессах РНК-интерференции, понижая экспрессию специфических генов, например в противовирусных реакциях и поддержании структуры хроматина. Молекулярные механизмы данных взаимодействий в настоящее время исследуются, в частности, была предложена гипотеза участия малых РНК в РНК-зависимом метилировании ДНК. Один из протоколов лечения СПИДа и несколько протоколов лечения рака в настоящее время проходят первую стадию клинических испытаний.

Интенсивно исследуется использование миРНК для лечения злокачественных опухолей. Но, как и в случае других противоопухолевых препаратов, направленная доставка в целевые клетки является одной из ключевых задач. Кроме того, РНК довольно крупная молекула, в биологических жидкостях она легко гидролизует. И наконец, нуклеиновые кислоты несут значительный отрицательный заряд, что негативно сказывается на их способности проникать через плазматическую мембрану. Обозначенные трудности можно преодолеть включением миРНК в наночастицы – в этом случае нуклеиновая кислота будет защищена от действия нуклеаз, с одной стороны, с другой стороны, эффект пассивного нацеливания должен способствовать накоплению в опухоли, и наконец, с третьей стороны, наночастицы могут быть конъюгированы с «молекулярным адресом», что еще в большей степени увеличит селективность доставки терапевтического препарата в опухолевые клетки.

В докладе рассматриваются главные аспекты использования миРНК как противоопухолевых средств: выбор целевого гена, типы наночастиц, используемых для загрузки миРНК, способы модификации наночастиц для придания им свойств направленного транспорта, преодоления мембраны клеток, главные результаты, полученные с использованием нанотранспортных систем для лечения злокачественных опухолей, перспективы развития данного направления.

П.С. Качесова<sup>1</sup>, О.Ф. Евстратова<sup>1</sup>,  
И.А. Горошинская<sup>1</sup>, Е.В. Шалашина<sup>1</sup>, В.Б. Бородулин<sup>2</sup>  
**ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНИ ОПУХОЛИ  
ПРИ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ ЦИНКА  
И СПЛАВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

<sup>1</sup>ФГУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России, Ростов-на-Дону

<sup>2</sup>ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

Интерес изучения действия на организм нанодисперсных порошков таких биогенных металлов, как цинк (Zn), медь (Cu), железо (Fe) обусловлен разнообразием их биологических функций. Участие данных элементов в реакциях свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты, регуляции апоптоза, активации протоонкогенов и др., связанных с процессами малигнизации и прогрессии опухоли, позволяет предполагать возможность их влияния на развитие опухоли и состояние механизмов противоопухолевой резистентности. Цель исследования – изучить структурно-функциональные изменения в ткани опухоли при воздействии НЧ цинка и сплава (Cu-Fe-Zn). Эксперимент проводился на белых нелинейных крысах-самках весом 200–250 г с перевиваемой саркомой 45 (С-45). Животные были разделены на три группы: первая – введение НЧ цинка; вторая – введение НЧ сплава; третья – контроль. Порошки металлов суспендировали в физиологическом растворе. Взвесь НЧ вводили в опухоль или внутривнутрибрюшинно (1,25 мг/кг массы), суммарная доза составила 10 мг/кг (доза восьмикратного введения). Контрольные животные получали физиологический раствор внутривнутрибрюшинно (0,3 мл). Животных декапитировали на 28–29 сутки после перевивки опухоли. Морфофункциональное состояние опухоли определялось с помощью соответствующих гистохимических методов и последующей морфометрией. В результате проведенных исследований было выявлено, что влияние НЧ на кинетику роста С-45 зависело от способа введения. При внутривнутриопухолевом введении НЧ цинка у всех животных была достигнута частичная регрессия опухоли (средний вес опухоли – 1,2±0,6 г, объем – 1,0±0,5 см<sup>3</sup>). Внутривнутрибрюшинное введение НЧ цинка привело к более интенсивному росту опухоли (увеличение веса на 54,8 % и объема на 28 % по сравнению с контролем). Введение нанодисперсного порошка сплава привело к полной регрессии саркомы у 50 % животных. При внутривнутриопухолевом введении – в 75 % случаев, при внутривнутрибрюшинном – в 25 % (вес остаточной опухоли 0,0–0,04 г, объем 0,0–0,065 см<sup>3</sup>). У остальных животных средние значения веса и объема опухоли не отличались от значений в контрольной группе. В контрольной группе у всех животных наблюдался рост С-45 (среднее значение веса опухоли – 5,2±0,7 г; объема – 6,0±0,9 см<sup>3</sup>); в большинстве полей зрения препарата опухоли находилось плотное расположение опухолевых клеток, содержащих до 6–8 фигур митоза, в том числе – атипичных. Исследование гистопрепаратов, полученных от животных с полной регрессией С-45, показало, что во всех полях зрения наблюдалась регрессия опухолевой ткани и замещение её соединительной тканью, инфильтрированной лимфо-плазмочитарными элементами и макрофагами. В случаях частичной регрессии С-45 микрокартина опухоли свидетельствовала о дистрофических изменениях большинства опухолевых клеток (в 3/4 полях зрения), с низким (до 3) содержанием в них фигур митоза и инфильтрацией лимфоидными

клетками. Обращало внимание, что даже у животных с продолженным ростом опухоли после введения НЧ цинка и сплава выявленная микрокартина ткани опухоли свидетельствовала об ее изменениях: кроме наличия участков некроза, обнаруживались группы дистрофически измененных опухолевых клеток с низкой плотностью их расположения и уменьшением количества фигур митоза. Таким образом, при введении нанодисперсного порошка цинка и сплава (Cu-Fe-Zn) происходит изменение динамики роста опухоли: усиление её роста, полная или частичная регрессия. Интересно, что даже при дальнейшем росте опухоли наблюдаются признаки её структурно-морфологической деструкции.

В.С. Косоруков<sup>1</sup>, К.А. Скрытник<sup>1</sup>, Е.М. Трещалина<sup>1</sup>,  
Н.В. Андропова<sup>1</sup>, Т.В. Комарова<sup>2</sup>, Ю.Л. Дорохов<sup>2</sup>  
**ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ  
ДЕЙСТВИЕ СУБСТАНЦИИ  
РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ  
ПРОТИВ ОНКОАНТИГЕНА HER2/NEU,  
ПОЛУЧЕННОЙ  
ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА**

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

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

*Her2/neu* – представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста, роль которого в этиологии и патогенезе ряда опухолей, в том числе РМЖ и рака яичников человека, считается доказанной. Примерно у 30 % больных раком молочной железы, так называемых HER2-позитивных и наиболее опасных форм рака, наблюдается суперпродукция этого онкобелка, что вызывает ускоренное метастазирование и устойчивость к терапевтическому воздействию. Известно, что полученные по технологии культивирования клеточных культур рекомбинантные антитела против этого антигена (Герцептин) имеют терапевтически значимый эффект и активно применяются в практике. Нами были созданы рекомбинантные гуманизированные антитела против антигена *Her2/neu* (Фитогермаб), получаемые с использованием оригинального подклада в растении *Nicotiana benthamiana*. Полученная субстанция имела достаточную для проведения чистоту и стабильность.

**Цель исследования.** Изучение противоопухолевого действия рекомбинантного антитела Фитогермаба на перевиваемом раке молочной железы человека с гиперэкспрессией *Her2/neu* у иммунодефицитных мышей.

**Материалы и методы.** Перевиваемый рак молочной железы человека SKBR3 представляет собой аденокарциному, содержащую на своей поверхности до  $1,6 \times 10^6$  рецепторов *Her2/neu* на клетку. В исследовании был использован штамм перевиваемого рака яичников человека SKBR3 из Коллекции РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, который формирует стабильные подкожные ксенографты у nude мышей. Клетки имплантировали подкожно в прививочной дозе 3 млн клеток на мыш. На 6-е сутки после прививки опухолевых клеток производили измерение опухолевых узлов и делили животных на три группы – контроль, лечение Фитогермабом и лечение препаратом сравнения Герцептином. Лечение антителами проводили инъекциями внутривнутрибрюшинно 9-дневным курсом: 1-я инъекция в дозе 20 мг/кг, вторая инъекция через 24 ч, а остальные 7 инъекций через 48 ч в разовой дозе 10 мг/кг. Курсовая доза составила 100 мг/кг, длительность курса – 15 дней, с 6 по 21 сутки. Контрольной группе вводили растворитель в соответствующих

объемах. Противоопухолевый эффект лечения оценивали по общепринятому показателю торможению роста опухоли (ТРО). Для вычисления  $T/C$  ( $treatment/control$ ) с помощью электронного измерителя многократно в процессе и после лечения измеряли опухолевые узлы и рассчитывали средние объемы ( $V_{ср}$ ) в каждой группе. Минимальный критерий эффективности  $T/C < 42\%$ .

**Результаты.** В опытной группе введение Фитогермаба осуществлялось в запланированном режиме при удовлетворительной переносимости лечения. Ухудшения состояния или гибели мышей в результате введения фитогермаба отмечено не было. В группе Фитогермаба на протяжении всего периода лечения и в течение 1 суток после лечения опухолевые узлы были достоверно в 11 раз меньше, чем в отрицательном контроле. Показатель ТРО на 11, 15, 19 и 22 дни составил 31 %, 20 %, 14 % и 9 % соответственно ( $p < 0,05$ ). В группе мышей, получавших Герцептин, размеры опухоли были достоверно более чем в 6 раз меньше, чем в группе контроля. ТРО составил 32 %, 22 %, 21 % и 15 % на 11, 15, 19 и 22 дни соответственно. Статистически достоверных различий с группой Фитогермаба не выявлено.

**Заключение.** Полученный эффект дает возможность охарактеризовать субмтанцию растительных антител Фитогермаб, как равноэффективную препарату Герцептин в отношении воздействия на аденокарциному молочной железы человека SKBR3.

*Е.А. Котова<sup>1</sup>, А.П. Полозкова<sup>1</sup>,  
Е.В. Игнатьева<sup>1</sup>, И.И. Краснюк<sup>2</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1</sup>*

#### **ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПЕГИЛИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЦИФЕЛИНА**

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

<sup>2</sup>ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Наряду с положительными свойствами обычных липосом (защита от биодegradации, постепенное высвобождение ЛВ, снижение токсичности, пассивное нацеливание в «горячие точки»), появляется нежелательное взаимодействие липосом с белками плазмы, в результате которого полученные комплексы захватываются из кровотока макрофагами ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). Из-за способности блокировать механизмы поглощения липосом клетками РЭС, за счет создания избыточного осмотического давления в примембранной области эффективным подходом является поверхностная модификация везикул гликолипидами, например производными полиэтиленгликоля.

**Задачи исследования.** Разработать оптимальный состав пегилированной липосомальной формы цифелина.

**Материалы и методы.** Многослойные липосомы (МСЛ) содержали лецитин, холестерин (Хол), ПЭГ-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин и цифелин в различных молярных соотношениях. После получения липидной пленки ее гидратировали 150 мМ раствором натрия хлорида.

Для получения однослойных липосом проводили экструзию МСЛ через мембранные фильтры 0,2 мкм. Эффективность включения цифелина определяли после стерилизующей фильтрации полученной эмульсии, поскольку неинкорпорированные в липосомальную оболочку кристаллы ЛВ задерживаются на фильтре и легко отделяются.

Количественное содержание цифелина определяли методом спектрофотометрии спиртового разведения полученных фракций и исходных липосомальных растворов.

**Результаты и выводы.** По результатам изучения различных составов липосом можно сделать следующие выводы. Избыточное количество холестерина не включается в мембрану и на стадии образования МСЛ образует обильный кристаллический осадок на дне колбы. Большое количество цифелина остается на фильтре при стерилизующей фильтрации; данное явление обусловлено высоким содержанием липидного производного ПЭГ-2000, которое, встраиваясь в мембрану везикул, занимает возможные участки связывания ЛВ. Введение малых количеств дополнительных компонентов прописи (Хол и ПЭГ-2000-ДСФЭ) также привело к затруднениям: пленку гидратировали длительное время, значительная часть образовала плотную массу и отмылась с колбы только органическим растворителем. Таким образом, разработан состав стерически стабилизированных липосом цифелина с оптимальным молярным соотношением ФХ: Хол: ПЭГ-2000-ДСФХ 165:8:1 и 12,4:1 к цифелину с включением ЛВ 98,32 %.

*Е.А. Котова<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, С.Г. Козеев<sup>2</sup>,  
А.В. Ланцова<sup>1</sup>, О.Л. Орлова<sup>1</sup>, С.А. Партолина<sup>1</sup>,  
Е.В. Игнатьева<sup>1</sup>, И.И. Краснюк<sup>2</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1</sup>*

#### **ОКИСЛЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ ЛИПОСОМ В ПРОЦЕССЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ**

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

<sup>2</sup>ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Основным деструктивным процессом в липидах является окисление, затрагивающее ненасыщенные связи жирных кислот. Перекисное окисление (ПО) липосомальных фосфолипидов представляет собой типичный свободнорадикальный процесс, продуктами которого являются диеновые конъюгаты, гидроперекиси, альдегидспирты, окси- и кетокислоты, которые отрицательно влияют на качество липосомального препарата.

**Задачи исследования.** Оценить степень окисленности липосомальных фосфолипидов по концентрации конечного продукта ПО – малонового диальдегида (МДА) после лиофилизации липосом, полученных различными технологическими методами.

**Материалы и методы.** Большие многослойные липосомы (БМЛ) содержали лецитин, холестерин, ПЭГ-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин в молярном соотношении 165:8:1, а в состав с антиоксидантом (АО) добавляли 13 мг 10%-го масляного раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата. После получения липидной пленки ее гидратировали 150 мМ раствором натрия хлорида. Для получения однослойных липосом применяли три метода: экструзию, измельчение УЗ и гомогенизацию. Моноламеллярные липосомы стерилизовали фильтрацией и смешивали с 40% стерильным раствором сахарозы в соотношении 3:1. Приготовленные образцы дозировали по 5 мл и подвергали сублимационной сушке. Концентрацию МДА определяли по стандартной методике с тиобарбитуровой кислотой.

**Результаты.** Уровень содержания МДА в БМЛ составил для пустых липосом (ПЛ) – 0,68 нмоль/мл, а для липосом с АО – 0,65 нмоль/мл. Гомогенизация и последующая лиофилизация липосом приводили к значительному повышению концентрации МДА (ПЛ – 3,74 нмоль/мл; липосомы с АО – 3,88 нмоль/мл). Содержание МДА после экструзии и лиофилизации ПЛ (3,69 нмоль/мл) и липосом с АО (3,81 нмоль/мл) по сравнению с БМЛ возросло более чем в 5 раз, а обработанные УЗ и лиофилизированные липосомы имели значения концентрации МДА для ПЛ – 4,93 нмоль/мл, для липосом с АО – 4,64 нмоль/мл.

**Выводы.** Уровень ПО возрастает при измельчении и лиофилизации липосом. Отрицательное влияние лиофилизации в большей мере выражено для липосом, измельченных УЗ. Степень окисленности липидов лиофилизированных липосом, полученных методами гомогенизации и экструзии, менее выражена. Разница концентраций МДА между ПЛ и липосомами с АО незначительна.

*Ю.М. Краснопольский<sup>1</sup>, А.Е. Степанов<sup>2</sup>, В.И. Швець<sup>2</sup>*  
**ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ ДОЦЕТАКСЕЛ**

<sup>1</sup>Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Харьков  
<sup>2</sup>МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва

**Задачи исследования.** Широкое распространение получило использование таксанов, в частности доцетаксела (ДТ), в качестве противоопухолевого лекарственного препарата. Доц обладает широким спектром противораковой активности. В то же время ДТ отличает высокая токсичность, а также крайне низкая растворимость в воде, что затрудняет подбор подходящих форм дозирования и значительные технологические трудности при производстве. Одним из приоритетных направлений в развитии современных фармацевтических технологий является разработка и создание терапевтических систем направленного действия, для чего с успехом применяются наносомальные носители лекарственных веществ, которые способны увеличивать нацеленность действия и обеспечивая увеличение биодоступности. Применение липосом (ЛС) в качестве носителей лекарственных веществ позволяет повысить селективность их действия и снизить токсичность. Использование ЛС актуально при лечении ряда заболеваний, в том числе злокачественных образований, когда оптимизация биораспределения сильнодействующих препаратов является решающим фактором для повышения их результативности и улучшения качества жизни пациента. Цель данного исследования заключалась в создании водорастворимой формы ДТ, включенного в липосомы.

**Материалы и методы.** Приготовление ЛС проводили методами, разработанными нами ранее. Препараты животным вводили внутривенно (в/в) и внутрибрюшинно (в/б). Определение величины частиц ЛС проводили методом фотонной корреляционной спектроскопии. Количественное определение посторонних примесей и содержания ДТ проводили методом ВЭЖХ.

**Результаты и выводы.** В ходе проведенного исследования изучена зависимость включения ДТ в ЛС при различном соотношении компонентов. При соотношении ДТ: фосфолипиды (ФЛ) выше 1:15 наблюдается полное включение цитостатика в ЛС; также было установлено, что размер ЛС в жидких образцах практически не зависит от соотношения ДТ и липидного компонента. Установлено количество ДТ, включенного в липидный бислой. Введением в состав ЛС дифосфатидилглицерина (ДФГ) мы стремились к повышению специфического действия ЛС, содержащих ДТ. Это предположение основано на известном факте взаимодействия ДФГ и ДНК хроматина с образованием структур, способных запускать программированную гибель клетки (апоптоз), в частности опухолевых клеток. После лиофилизации препаратов доказано сохранение размеров ЛС в нанодиапазоне.

Размер ЛС в лиофилизированных образцах зависит от соотношения ДТ/ФЛ и от концентрации липидной субстанции. Увеличение в составе образцов ЛС фосфатидилхолина и лактозы стандартизует и стабилизирует ЛС после регидратации.

Изучено влияние температурных параметров растворителя на размер ЛС при регидратации; кроме того, размер ЛС и их стабильность после регидратации зависит от соотношения массы продукта и количества взятого растворителя. Изучены физико-химические свойства ЛС. Проведено изучение токсичности ЛС образцов, содержащих ДТ по сравнению с его свободной формой, определена величина LD<sub>50</sub>. Использование ЛС форм ДТ продемонстрировало отсутствие снижения токсичности при в/б введении и обнаружен эффект при в/в введении. В докладе представлены данные по изучению цитотоксической активности ЛС препаратов на линейных мышах C<sub>57</sub>Bl, DBA с перевитыми международными штаммами опухолей: метастазирующая карцинома Льюиса, солидный рак Эрлиха и лимфолейкоз L<sub>1210</sub>. Установлено, что фармакологическая активность ЛС после регидратации препарата зависит от состава образцов, а именно от соотношения между таксаном, фосфатидилхолином и криопротектором.

*Н.Р. Кузнецова<sup>1</sup>, Е.В. Свирицкая<sup>1</sup>,  
 Н.С. Ситников<sup>2</sup>, А.С. Шавырин<sup>3</sup>, И.П. Белецкая<sup>4</sup>,  
 А.Ю. Федоров<sup>2</sup>, Е.Л. Водовозова<sup>1</sup>*

**НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЛИПОСОМЫ, НАГРУЖЕННЫЕ ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ АНАЛОГА КОЛХИЦИНА: ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

<sup>1</sup>ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

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

<sup>3</sup>Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН, Нижний Новгород

<sup>4</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

**Задачи исследования.** Доставка лекарств в опухоли в виде липофильных пролекарств в мембране липосом позволяет уменьшить утечку препарата в процессе циркуляции в кровотоке и при взаимодействии с клеткой-мишенью, а также изменить механизм проникновения лекарства в клетку и его внутриклеточный трафик. В данной работе получены липосомы, несущие сложнэфирные липофильные конъюгаты нового антимиотического агента – триазольного производного колхицина (trAzCh), лиганда колхицинового сайта тубулина. Исследована цитотоксичность липосомальных препаратов в сравнении с trAzCh в 6 культурах опухолевых клеток человека.

**Материалы и методы.** Экструзионные 100-нм-липосомы состава яичный фосфатидилхолин / фосфатидилинозит из *S. cerevisiae* / пальмитоильное или олеоильное производные trAzCh (Pam-trAzCh и Ole-trAzCh) 8:1:1 получены на установке Mini-Extruder (Avanti, США) при 30 °С. Использовали линии эпителиальных клеток HBL-100 (молочная железа) и HEK-T (почка) и лимфобластных клеток K-562, TNP1, RPMI 88 и CCRF-CEM. Цитотоксическую активность определяли с помощью МТТ-теста в течение 72 ч в серии разведений препаратов от 10 мкМ до 1 нМ.

**Результаты.** Показано, что липосомы среднего диаметра 100 нм количественно включают 10 моль % Pam-trAzCh или Ole-trAzCh. Практически во всех культурах клеток наблюдается одинаковая тенденция: цитотоксичность липосомальных препаратов несколько превышает таковую исходного trAzCh. Значения IC<sub>50</sub> для trAzCh – от 0,15 мкМ до 10

мкМ, а для липосом с Pam-trAzCh или Ole-trAzCh – от 0,05 мкМ до 0,8 мкМ.

**Выводы.** Можно предположить, что доставка нового антимитотического агента к внутриклеточной мишени – тубулину – облегчается за счет включения его липофильных производных (гидролизующих эстеразами) в липосомы. Необходимы исследования токсичности липосомальных препаратов нового аналога колхицина на животных.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 09-03-00647 и № 10-04-01021) и ФЦП (контракт 16.740.11.0476).*

*В.Н. Кулаков, А.А. Липенгольц*

### **БИНАРНАЯ ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ: ПРИНЦИПЫ, ОБЕСПЕЧЕНИЕ, ПЕРСПЕКТИВЫ**

*Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва*

Дистанционная лучевая терапия (ДЛТ) с использованием ионизирующего излучения в настоящее время является наиболее востребованной терапевтической технологией в лечении злокачественных новообразований. Развитие методов ДЛТ можно разделить на два основных этапа: традиционная ДЛТ – техническое совершенствование медицинских источников ионизирующего излучения, преимущественно гамма-излучателей и электронных ускорителей, а также использование источников адронного излучения (нейтроны, протоны, заряженные ионы).

Широкое клиническое использование адронного излучения ограничивает высокая стоимость аппаратуры – ядерные реакторы, циклотроны и т.д. В традиционной ДЛТ основным источником побочных эффектов является повышенная лучевая нагрузка на нормальные ткани, избежать которую не удастся даже в технологиях томотерапии, когда обеспечивается максимально точное наведение потока ионизирующего излучения на мишень.

Дальнейшее развитие лучевой терапии связано, в первую очередь, со становлением бинарных лучевых технологий и их внедрением в клиническую практику.

В работе дается классификация современных технологий для бинарной лучевой терапии (БЛТ) злокачественных новообразований. В отдельную группу объединены БЛТ на основе ионизирующего излучения – потоки нейтронов и рентгеновского излучения. Даются общие представления о механизмах БЛТ: нейтронозахватная (НЗТ), фотонозахватная (ФЗТ) терапии и фотодинамическая терапия (ФДТ). Проводится анализ состояния в мире обеспечения БЛТ основными компонентами – источниками ионизирующего излучения и специальными препаратами, применение которых обеспечивает вторичное локальное выделение энергии, величина которой является губительной для клеток облучаемой мишени.

Потенциальные возможности БЛТ сравниваются с терапевтическими возможностями ФДТ. Обсуждаются терапевтические возможности БЛТ и ФДТ, а также перспективы их широкого клинического применения в терапии злокачественных новообразований.

Основным фактором, тормозящим внедрение технологий БЛТ в клиническую практику, является отсутствие в настоящее время лекарственных средств, обеспечивающих высокий коэффициент дифференциального накопления необходимых элементов ( $^{10}\text{B}$ , Gd, Bi и других элементов с порядко-

вым номером  $Z > 52$ ). Обсуждаются перспективы применения для поиска эффективных субстанций предложенной нами системы скрининга.

Рассматриваются перспективы различных направлений для создания новых эффективных лекарственных средств для реализации технологий БЛТ. Обсуждаются перспективы реализации дизайна лекарственных средств при современном состоянии развития химии, супрамолекулярной химии и нанотехнологии.

*А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова,*

*Н.М. Перетолчина, Е.В. Санарова*

### **НАНОСТРУКТУРИРОВАННАЯ ЛИПОСОМАЛЬНАЯ**

### **ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ЛИЗОМУСТИНА**

*РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

Одним из основных методов лечения онкологических заболеваний является химиотерапия. Однако эффективность данного метода достаточно низкая, а побочные эффекты, оказываемые на организм пациента, зачастую настолько сильны, что приводят к гибели человека не от основного заболевания, а от воздействия химиопрепарата на ранее здоровые органы и системы организма.

Избирательное поступление препарата непосредственно в опухоль и направленное воздействие на неё позволяет значительно снизить побочное действие на нормальные клетки и максимально увеличить терапевтический эффект лекарственного средства.

Данную ситуацию кардинальным образом может изменить применение наноструктурированных противоопухолевых препаратов.

Лизомустин – оригинальный отечественный противоопухолевый препарат, хлорэтильное производное нитрозомочевины на основе L-гомоцитруллина. Клиническое изучение лизомустина показало эффективность препарата при мелкоклеточном раке легкого и меланоме кожи.

**Цель исследования.** Для расширения возможностей клинического изучения препарата Лизомустин, разработать наноструктурированную лекарственную форму в виде липосом для внутривенного введения и провести ее биофармацевтическое изучение.

**Материалы и методы.** Субстанция лизомустина (ООО «Академфарм»); «Лизомустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,1 г» (ООО фирма «ГЛЕС»); Липосомальная наноструктурированная дисперсия лизомустина с использованием дистеароилфосфатидилэтаноламинполиэтиленгликоля-5000 (Avanti Polar Lipids, США) (лаборатории разработки лекарственных форм. НИИ ЭДнТО РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН).

**Результаты и выводы.** Разработана наноструктурированная пегилированная липосомальная лекарственная форма Лизомустина.

Липосомы лизомустина получали гидратацией липидной пленки, образующейся после упаривания в вакууме растворов липидов, водным раствором субстанции лизомустина с последующей экстракцией липосомальной дисперсии через поликарбонатные мембраны с уменьшающимся диаметром пор.

Показан высокий противоопухолевый эффект наноструктурированной лекарственной формы Лизомустина на лимфобластом лейкозе L-1210 во всех тестируемых дозах (125–250 мг/кг), который выражен в расширении диапазона терапевтических доз и снижении токсичности препарата.

*Работа поддержана грантом Президента РФ для молодых российских ученых кандидатов наук.*

Г.Н. Маслякова<sup>1</sup>, А.Б. Бучарская<sup>1</sup>, Н.А. Наволокин<sup>1</sup>,  
А.А. Широков<sup>2</sup>, А.М. Буров<sup>2</sup>

#### ПРИМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В НАНООНКОЛОГИИ

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

В настоящее время в биомедицинских исследованиях широко применяются нанотехнологии, которые позволяют улучшить раннюю диагностику опухолей за счет повышения качества визуализации, и, следовательно, оптимизировать лечение новообразований. Морфологические методы исследования остаются «золотым» стандартом при диагностике опухолей и определении степени патоморфоза новообразований при воздействии различных химических и физических факторов, в том числе под влиянием наночастиц.

**Цель исследования.** Проведение сравнительного анализа информативности различных методов морфологического определения патоморфоза в перерезаемых опухолях лабораторных животных при различных путях введения наночастиц.

**Материалы и методы.** Наночастицы железа, 30 самцов белых беспородных крыс, перевиваемый рак почки и печени крыс, морфологические методы, морфометрические методы.

**Результаты и выводы.** При проведении стандартного морфологического исследования с окраской гистологических срезов гематоксилином и эозином существенных различий в опухоли до и после введения наночастиц железа обнаружено не было. При применении морфометрических методик были установлены изменения размера и площади, а также ядерно-цитоплазматического коэффициента в клетках опухоли и количества сосудов, что позволило оценить структурные изменения опухоли. Применение гистохимических методов исследования позволяет выявить нарушения обменных процессов в клетках опухоли, степень выраженности склероза и т.д. Идеальным вариантом дополнительных методов исследования является применение иммуногистохимии, позволяющей судить о пролиферативной активности клеток и степени выраженности апоптоза. Таким образом, для получения полной информации о биологической активности опухоли, степени ее патоморфоза и возможного определения прогноза заболевания необходимо использовать весь комплекс морфологических методов исследования от стандартных окрасок до иммуногистохимических исследований.

О.В. Минаева, Н.Н. Зырняева, Г.С. Столяров,  
А.А. Фирсов, О.Е. Лунина, Н.А. Плотникова

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ МАГНИТНОЙ ЖИДКОСТИ НА ОСНОВЕ МАГНЕТИТА Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

ГОУ ВПО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск

Магнитные жидкости (МЖ) могут быть использованы в системах направленной доставки лекарственных препаратов, индукционной гипертермии и различных диагностических методах. Для биомедицинского применения МЖ необходимы данные о ее токсичности.

**Цель работы.** Исследовать острую токсичность магнитной жидкости на основе магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> при

ее внутривенном введении и определить причину гибели животных.

**Материал и методы.** В данной работе была использована магнитная жидкость на основе магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, стабилизированного олеиновой кислотой. Частицы магнетита в коллоидном растворе имеют преимущественно сферическую форму и размеры 5–15 нм, что подтверждено данными инфракрасной дифрактометрии и электронной микроскопии. Концентрация Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в коллоиде была равна 25 мг/мл. Исследование проводилось на 50 нелинейных половозрелых лабораторных крысах массой 220–280 г. Животные были разделены на 5 групп по 10 особей в каждой. В контрольной группе животным внутривенно вводили 1 мл изотонического раствора натрия хлорида. В 1-й – 4-й опытных группах внутривенно вводили магнитную жидкость в объемах, обеспечивающих попадание в кровотоки 75, 150, 300 и 450 мг/кг Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Павших крыс вскрывали, оценивали макро- и микроскопическую картину внутренних органов. Определяли значение максимально переносимой дозы (МПД), абсолютно смертельной дозы (LD<sub>100</sub>) и среднесмертельной дозы (LD<sub>50</sub>). Данные показатели определяли в пересчете на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

**Результаты.** Максимально переносимая доза МПД магнитной жидкости составляла 150 мг Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> на 1 кг массы тела животного. Абсолютно смертельная доза составляла 450 мг Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> на 1 кг массы тела животного, рассчитанное значение среднесмертельной дозы LD<sub>50</sub> составило 378 мг Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> на 1 кг массы тела. При введении абсолютно смертельной дозы МЖ смерть животного наступала в течение 1–30 минут после инъекции. Причиной смерти была микроэмболия легочных сосудов, что подтверждалось на вскрытии: находили увеличенные в размерах, полнокровные легкие, расширенные правые камеры сердца и полые вены. При микроскопическом исследовании легких отмечалось полнокровие сосудов, в ряде случаев – лейкоцитарная инфильтрация межальвеолярных перегородок, ателектазы. В других органах значимых макро- и микроскопических изменений не определялось.

**Выводы.** Магнитная жидкость на основе магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, стабилизированного олеиновой кислотой, является малотоксичным соединением и может быть использована для биомедицинских целей. Однако при ее применении необходимо учитывать возможность отдаленного токсического действия.

*Работа выполнена при поддержке гранта Президента молодым кандидатам наук МК-5268.2011.7.*

Н.А. Наволокин, А.Б. Бучарская, С.М. Кун,  
Г.Н. Маслякова, Г.С. Терентюк, Б.Н. Хлебцов,  
Н.Г. Хлебцов

#### ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНАХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ НАНОБОЛОЧЕК ЗОЛОТА

ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

В мире отмечается неуклонный рост смертности от злокачественных новообразований. Традиционные методы лечения имеют ряд побочных действий и часто малоэффективны, возрастает необходимость разработки новых методов лечения с использованием высоких технологий, в частности ЗНЧ, которые могут применяться для диагностики и лечения опу-

холей. Известно, что золото проявляет высокую химическую активность, обусловленную его физико-химическими свойствами, в связи с чем возникает необходимость в изучении токсичности ЗНЧ.

**Цель исследования.** Изучить динамику морфологических изменений во внутренних органах лабораторных животных при введении ЗНЧ.

**Материалы и методы.** Золотые нанооболочки диаметром 160 нм (концентрация золота 153 мкг/мл), белые беспородные крысы – самцы, морфологические методы. Белым беспородным крысам внутривенно вводили в хвостовую вену 1 мл золотых нанооболочек. В динамике через определенные промежутки времени забирались органы для гистологического исследования.

**Результаты.** В печени через 30 мин наблюдалось незначительное полнокровие и зернистость, вакуолизация цитоплазмы. Через 1,5 ч – умеренное полнокровие внутрипеченочных сосудов и сепарация крови, увеличение клеток Купфера, фрагментация цитоплазмы гепатоцитов. Через 8 ч – умеренное полнокровие и белковая дистрофия гепатоцитов. В селезенке через 30 мин нет четкого деления на красную и белую пульпу, полнокровие. Через 1,5 ч – умеренное полнокровие, появляется четкая граница. Через 4 ч – выраженное полнокровие и большое количество скопления черных гранул. В почках через 30 мин – неравномерное полнокровие клубочков, дистрофия эпителия извитых и прямых канальцев и отек мозгового вещества. Умеренное полнокровие сосудов и сепарация крови. Через 1,5 ч клубочки малокровные, капсула свободная, эпителий прямых и извитых канальцев дистрофичен. Через 8 ч клубочки обычных размеров, просвет капсулы свободный. Умеренная дистрофия извитых канальцев и полнокровие коры.

**Выводы.** Морфологические изменения во внутренних органах при внутривенном введении золотых наночастиц зависят от времени и носят обратимый характер.

*Н.А. Наволокин, Г.Н. Маслякова, Х.М. Kong, О.В. Матвеева, А.Б. Бучарская*

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВО ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ОДНОКРАТНОМ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫХ НАНОЧАСТИЦ**

*ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов*

Развитие нанобиотехнологий привело к возникновению новой области медицины – наноонкологии. В настоящее время наиболее перспективными считаются использование НЧ для диагностики в качестве контрастного вещества для магнитно-резонансной томографии. Однако остаются малоизученными факторы потенциальной токсичности НЧ, связанные с высокой реакционной способностью НЧ, поэтому необходимо изучение влияния НЧ железа на живые организмы для выявления наиболее безопасного и эффективного вида частиц для последующего применения их в медицине.

**Цель исследования.** В экспериментах изучить морфологические изменения в органах лабораторных животных при однократном пероральном введении наночастиц Fe.

**Материалы и методы.** Наночастицы Fe 70 нм. ± 10 нм., 12 самцов белых беспородных мышей и 12 самцов белых беспородных крыс, морфологические методы.

Было выделено 2 группы животных – 6 самцов мышей и 6 крыс, получавших перорально однократно раствор наночастиц Fe (5 мг/кг), 2 контрольные группы (по 6 самцов белых мышей и крыс) получали однократно 1 мл 0,9 % раствора NaCl перорально. Все животные выводились из эксперимента путем декапитации через 2 ч.

**Результаты.** В толстом и тонком кишечнике как у крыс, так и мышей крипты имели нормальное строение, но в подслизистой тонкого кишечника обнаруживались лимфатические фолликулы без светлого герментативного центра, а также скопления лимфоидных инфильтратов в слизистой оболочке. В печени определялась нормальная архитектура, отмечалось умеренное полнокровие сосудов и скопление гранул гемосидерина вокруг порталных трактов. В почках при однократном пероральном введении наночастиц клубочки и канальцы не были изменены, отмечалось умеренное полнокровие сосудов мозгового слоя. В селезенке наблюдалось преобладание красной пульпы над белой, в лимфатических фолликулах определялись активные центры и большое скопление гранул гемосидерина.

**Выводы.** При гистологическом изучении изменения во внутренних органах при введении наночастиц проявлялись в виде нарушения кровонаполнения, повреждения клеток были выражены минимально.

*В.Ю. Науменко, А.Г. Аюпджанов, Н.Л. Шимановский*

**ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ И НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ В КАЧЕСТВЕ СУБСТАНЦИИ РЕНТГЕНОКОНТРАСТНОГО СРЕДСТВА, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ**

*РГМУ им. Н.И. Пирогова, Москва*

**Задачи исследования.** Методика визуализации внутренних органов с применением рентгеноконтрастных средств (РКС) является актуальной и применимой в современной онкологии. У применяемых йодированных препаратов высокая эффективность контрастирования требует применения большой дозы вводимого средства, которая оказывает тиреостатический эффект и может быть причиной нефропатии. Для создания РКС без атомов йода предлагается использовать биосовместимые наночастицы оксида железа. Задача исследования – сопоставить размеры частиц и длины волны рентгеновских квантов или медленных нейтронов для оценки дополнительного рассеивания и, следовательно, увеличения эффективного пути кванта в материале.

**Материалы и методы.** Приведено теоретическое обоснование увеличения поглощающей способности дополнительным рассеянием на наночастицах. Рассмотрены механизмы рассеяния: рассеяние на границе раздела фаз и когерентное рассеяние рентгеновского излучения.

**Результаты.** Механизм рассеяния на границе раздела фаз основан на том, что наночастица обладает сильно развитой внутренней поверхностью. При скользящих углах падения кванты испытывают внешнее отражение от поверхности частиц в области малоуглового рассеяния. В случае малого размера и большой концентрации рассеивающих центров вклад такого рассеяния достаточно заметен. Изучен характер зависимости среднего угла рассеяния на единицу длины пути  $\langle \varphi_s^2 \rangle$ , который свидетельствует о том, что величина среднего угла рассеяния обратно пропорциональна размеру наночастиц. Когерентное рассеяние обусловлено соизмеримостью

размера наночастиц с длиной волны рентгеновского излучения, что приводит к распределению интенсивности излучения по конусу с углом раствора  $\sim \lambda/a$ , где  $\lambda$  – длина волны излучения,  $a$  – размер частицы. Оценен средний квадрат угла рассеяния фотона на единицу длины пути  $\langle \theta_s^2 \rangle$ . Решение уравнения (2) переноса (1), с учетом  $\langle \varphi_s^2 \rangle$  и  $\langle \theta_s^2 \rangle$  дало коэффициент  $\beta$  (3), определяющий во сколько раз увеличивается ослабления пучка рентгеновского излучения в случае наноматериала по сравнению с массивным образцом. При размере частиц 5–9 нм, он оказался равным  $\beta \approx 1,32 \div 1,52$ .

*В.Ю. Науменко, А.Г. Аконджанов, И.В. Быков, Н.Л. Шимановский*

### ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

*РГМУ им. Н.И. Пирогова, Москва*

В последние годы для профилактики и лечения онкологических заболеваний активно развиваются различные варианты локальной магнитной гипертермии, в которой вводимый в пораженный участок магнитный материал нагревается извне с помощью электромагнитного излучения диапазона 100–800 кГц, которое практически не поглощается тканями организма, но интенсивно взаимодействует с наночастицами ферромагнетиков. В качестве медиаторов наиболее приемлемыми являются наночастицы сложного оксида железа – магнетита, с размером частиц от 30 до 50 нм, характеризующихся температурой Кюри около 42–44 °С, что соответствует температуре гибели онкологических клеток. При достижении данной температуры вследствие магнитного фазового перехода процесс поглощения энергии внешнего излучения частицей прекращается и дальнейшего нагревания не происходит.

Движением таких наночастиц можно управлять посредством наложения внешнего магнитного поля и локализовать их в необходимой области или органе.

Проведенные исследования на различных культурах клеток как здоровых, так и патологических показали, что при специальной модификации поверхности наночастицы сложного оксида железа данного размера безопасны для живой ткани и не оказывают существенного влияния на процессы, происходящие в клетке.

Исследования проводились с помощью МТТ-теста при различных временах инкубирования. Исследование процесса внешнего нагрева клеточных структур при введении в них наночастиц также не выявило отклонений от нормы.

Данный результат позволяет исключить все внешние воздействия, за исключением действия электромагнитного излучения.

Имеются данные о лечении опухолевого образования у лабораторных крыс с глиомой Т-9 и применением магнитной жидкости на основе сложного оксида железа. Препарат вводится непосредственно в опухоль под наркозом, затем опухоль подвергается воздействию внешнего магнитного поля, в результате чего наночастицы железа нагреваются до температуры 45 °С. Опухоли исчезли после трехкратной гипертермии по 30 мин в течение 30 дней (118кВт, 30,7 кА/м) и в течение 3 мес. не рецидивировали.

Таким образом, нанотехнологии с использованием железа позволяют получать эффективные препараты для магнитной гипертермической терапии различных опухолей.

*Д.В. Новиков, Т.В. Белова, Е.С. Плеханова, А.В. Калугин, А.В. Алясова,*

*Е.Ю. Контрощикова, В.В. Новиков*

### ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ ДНК-ЧИПА

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород*

**Задачи исследования.** Расширение возможностей клинично-лабораторной диагностики и мониторинга онкологических заболеваний в последнее время связывают с созданием нового поколения средств многопараметрической диагностики – биочипов, позволяющих одновременно определять широкий спектр онкологических маркеров разной природы. К таким маркерам относят продукты экспрессии раково-тестикулярных (РТ) генов (от англ. cancer/testis). Одновременное выявление комбинации из нескольких мРНК РТ генов с использованием ДНК-чипа может служить способом обнаружения циркулирующих в периферической крови опухолевых клеток. Задачей настоящего исследования явился анализ частоты обнаружения мРНК РТ генов в периферической крови больных различными онкологическими заболеваниями.

**Материалы и методы.** В работе использовали образцы периферической крови больных раком эндометрия (РЭ), желудка (РЖ), молочной железы (РМЖ), легкого (РЛ), почки (РП), меланомой и колоректальным раком (КР). Для обнаружения мРНК РТ генов использовали «гнездовой» вариант ОТ-ПЦР. Результаты реакции оценивали методами электрофореза нуклеиновых кислот или гибридизацией на ДНК-чипе.

**Результаты и выводы.** Периферическую кровь онкологических больных тестировали на присутствие мРНК шести генов MAGEA, девяти генов GAGE, трех генов SSX, генов NY-ESO-1, XAGE1, MAGEC1, BAGE и TRAG. Установлено, что частота обнаружения мРНК исследуемых генов варьировала в зависимости от заболевания и его стадии. Суммарная частота обнаружения мРНК РТ генов в периферической крови больных РЛ составила 90 %, КР – 80 %, РМЖ – 75 %, РП – 70 %, РЖ – 75 %, РЭ – 45 % и меланомой – 55 %. Таким образом, тест на присутствие мРНК РТ генов применим для обнаружения циркулирующих в периферической крови опухолевых клеток у больных различными формами рака.

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».*

*С.В. Новикова, Н.А. Сахарнов, Д.В. Новиков, А.Д. Перенков, А.В. Алясова*

### АНАЛИЗ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА $\alpha$ -ЦЕПИ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ПРИ РАКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород*

**Задачи исследования.** Экспрессия альфа цепи рецептора интерлейкина-2 (IL2RA) обнаружена во многих типах опухолевых клеток. Установлено, что экспрессия IL2RA сопровождается повышением уровня пролиферации опухолевых клеток, увеличением уровня экспрессии антиапоптотических белков и повышением устойчивости к лекарствам, что может быть использовано при мониторинге

онкологических заболеваний с использованием биочипов. В настоящее время много внимания уделяется связи метилирования с опухолеобразованием, для ряда генов определен статус метилирования в различных типах опухолей, что используется в качестве диагностического и прогностического маркера при онкологических заболеваниях. Целью настоящей работы явился анализ статуса метилирования промоторного региона гена IL2RA в клетках опухолевых очагов, полученных от больных раком толстого кишечника.

**Материалы и методы.** Исследовали 8 образцов опухолевых очагов больных раком толстого кишечника. Характер экспрессии гена IL2RA определяли методом ОТ-ПЦР с использованием разработанных авторами праймеров. Анализ статуса метилирования промоторной области гена IL2RA проводили с использованием рестриктаз HpaII, HhaI, AclI, чувствительных к метилированию CpG-динуклеотидов, и последующей ПЦР. Для оценки полноты гидролиза ДНК использовали плазмиду, содержащую последовательность гена альбумина человека.

**Результаты и выводы.** Во всех исследованных образцах клеток опухолевых очагов больных раком толстого кишечника обнаружена мРНК гена IL2RA. Анализ промоторной области гена IL2RA с использованием рестриктаз показал метилирование цитозина в позициях -313, -74, +100, +105, +128, +131, +185, +198, +307 относительно сайта инициации транскрипции во всех исследованных образцах. Высокочувствительный метод анализа метилирования с помощью рестриктаз позволяет выявить метилирование цитозина в единичных молекулах ДНК. С другой стороны, обнаружение мРНК гена IL2RA в образцах опухолевых очагов говорит об активности гена, а значит о предполагаемом отсутствии метилирования его промоторной области. Полученные результаты могут свидетельствовать о неоднородности паттерна метилирования гена IL2RA в клетках одного опухолевого очага.

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».*

*И.Н. Павлова, О.М. Канапацкова, Т.А. Федорова*  
**ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НУКЛЕИНАТА НАТРИЯ У БОЛЬНЫХ**

**МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННЫМ РМЖ НУЗ ДКД на ст. Саратов-1, СГМУ, Саратов**

Одним из важных показателей эффективности любого метода лечения является как годовичная летальность, так и продолжительность жизни больных. В условиях данной работы судьба пациенток прослежена на протяжении пяти лет. Приведенные данные свидетельствуют об уменьшении процента потерь больных в тех подгруппах, где в состав противоопухолевой терапии включался нуклеинат натрия (НН), разработанный ЗАО «Биоамид» (г. Саратов) на основе микробной биотехнологии и выпускаемый ОАО «Биосинтез» (г. Пенза) в форме наноразмерных олигонуклеотидов.

**Материалы и методы.** Была отслежена судьба 240 женщин с диагнозом рак молочной железы IV–IIIА стадии. Группа I – 64 больных, в комплексное лечение которых входил НН; группа II – 176 больных, в комплексное лечение был включен НН. Обследование больных осуществлялось после оконча-

ния каждого этапа лечения, а также в течение 5 лет последующего наблюдения. Обязательно учитывались возникающие в процессе лечения осложнения. Основными критериями эффекта введения НН в комплекс мероприятий являлись изменения параметров иммунитета, пятилетняя выживаемость пациенток и качество жизни больных после лечения.

**Результаты и выводы.** При анализе показателей клеточного звена иммунитета (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-клетки) через пять лет после лечения в I группе констатировано приближение к исходным величинам уровней CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-клеток, то есть компонентов клеточного звена. Во II группе отмечается лишь тенденция к нарастанию соответствующих показателей. В отношении гуморального звена иммунитета в I группе все показатели значительно отставали от исходного уровня. В отличие от I группы во II группе через пять лет показатели как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета не только восстановились до исходных уровней, но и в некоторых случаях превысили их (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-клетки, IgA, IgG). Все приведенное дает реальное основание для положительного применения препарата НН в процессе комплексного лечения больных раком молочной железы.

*Л.А. Пашева<sup>1,3</sup>, Н.Б. Преснякова<sup>2</sup>,  
О.Н. Горшененко<sup>3</sup>, Г.Л. Туманина<sup>3</sup>, В.В. Новиков<sup>1,2</sup>*

**СЫВОРОТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ HLA-I, CD8 И КОМПЛЕКСОВ HLA-I-CD8 У ДЕТЕЙ С В-КЛЕТОЧНЫМ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

<sup>2</sup>Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород

<sup>3</sup>Нижегородская областная детская клиническая больница, Нижний Новгород

**Задачи исследования.** Наноструктурная организация пула растворимых дифференцировочных молекул и молекул гистосовместимости характеризуется наличием в межклеточном пространстве и биологических жидкостях не только белковых молекул, находящихся в мономерном состоянии, но и различного рода наноразмерных белковых ассоциатов, в частности растворимых комплексов, состоящих из молекул HLA I класса и CD8. Их количественное содержание может быть ассоциировано с особенностями развития онкологических заболеваний (Новиков В.В. и др., 2008). Целью настоящей работы является сравнительное определение среднего уровня растворимых молекул CD8 (sCD8), HLA I класса (sHLA-I) и комплексов HLA-I-CD8 в сыворотке крови здоровых детей и детей с диагнозом В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ).

**Материалы и методы.** Использовано 12 образцов сыворотки крови детей от 2 до 17 лет с диагнозом В-ОЛЛ (в том числе 9 – с иммуноподвариантом пре-пре-В(II) ОЛЛ (common) и 3 – с иммуноподвариантом пре-В (III) ОЛЛ), полученных до начала индукции ремиссии. В качестве контроля исследовали 54 образца сыворотки крови практически здоровых детей сходного возраста. Определение уровня растворимых молекул проводили двухсайтовым иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител серии ИКО.

**Результаты и выводы.** Выявлено, что содержание молекул sHLA-I, sCD8 и растворимых комплексов HLA-I-CD8 в сыворотке крови как здоро-

вых детей, так и детей, больных В-ОЛЛ, характеризуется высокой вариабельностью. У детей с В-ОЛЛ обнаружено статистически значимое повышение среднего сывороточного уровня молекул sHLA-I и комплексов HLA-I-CD8 в 1,56 и 1,9 раза соответственно по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Сывороточный уровень молекул sCD8 у детей, больных В-ОЛЛ, находился в пределах нормы, однако обнаруживалась статистически незначимая тенденция к повышению.

*Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».*

*А.Д. Перенков<sup>1</sup>, Д.В. Новиков<sup>1</sup>, А.В. Алясова<sup>1</sup>,  
А.Ю. Барышников<sup>2</sup>, В.В. Новиков<sup>1</sup>*

#### **ВСТРЕЧАЕМОСТЬ мРНК ГЕНА CD38 В ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГАХ БОЛЬНЫХ КРР НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

<sup>1</sup>НИИ молекулярной биологии и региональной биологии ННГУ им Н.И. Лобачевского, Н. Новгород  
<sup>2</sup>РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

Одним из нанобиотехнологических подходов, используемых для мониторинга онкологических заболеваний, является использование биочипов. С их помощью исследуется характер экспрессии генов при онкологических заболеваниях. CD38 один из таких генов, что делает его потенциальным кандидатом для включения в биочип. Ген CD38 кодирует белок с бифункциональной активностью: цАДФ-рибоза-метаболизирующий фермент и молекула адгезии. Из литературных данных известно, что в нормальной ткани кишечника ген CD38 не экспрессируется, а в опухолевых клетках при КРР возможна его активация.

**Цель исследования.** Изучение частоты обнаружения мРНК гена CD38 в опухолевых клетках больных КРР на разных стадиях заболевания.

**Материалы и методы.** Исследовали 47 образцов опухолевых очагов больных КРР. Матричную РНК молекулы CD38 выявляли методом ОТ-ПЦР.

**Результаты.** Частота обнаружения полноразмерной формы мРНК молекулы CD38 у больных колоректальным раком составила 62 % (29 из 47). На фоне полноразмерной формы мРНК у 25,5 % (12 из 47) больных выявлялась альтернативная форма. Проведено сравнение частоты обнаружения мРНК CD38 на разных стадиях заболевания и степени дифференцировки клеток опухолевого очага. Обнаружено статистически значимое снижение частоты встречаемости мРНК на второй стадии заболевания в сравнении с первой, так же на второй стадии заболевания в опухолевых очагах альтернативная форма мРНК CD38 обнаруживалась статистически реже, чем полноразмерная. Выявлена тенденция к увеличению частоты обнаружения мРНК альтернативной формы при уменьшении степени дифференцировки клеток опухоли. Статистически значимых различий по частоте обнаружения мРНК молекулы CD38 между больными с наличием и отсутствием метастазов обнаружено не было. Из полученных данных можно сделать предположение, что экспрессия гена CD38 ассоциирована с гипо- и гиперметилированием генома, характерного для опухолевого процесса.

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».*

*Е.С. Плеханова, Д.В. Новиков, Т.В. Белова,  
А.В. Калугин, В.В. Новиков*

#### **РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ мРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЧИПА**

*Нижегородский государственный университет им.  
Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород*

**Задачи исследования.** Матричная РНК раково-тестикулярных генов является маркером опухолевых клеток, применяемым для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. Одновременное обнаружение сразу нескольких мРНК раково-тестикулярных генов позволяет повысить чувствительность и информативность теста. Задачей работы явилась разработка метода мультиплексной ПЦР для обнаружения мРНК 16 раково-тестикулярных генов MAGEA1-6, NY-ESO-1, SSX1,2,4, XAGE-1, MAGE-C, HAGE, MAGE-B1 и 2, TRAG-3.

**Материалы и методы.** В работе использовали образцы опухолевых очагов рака толстого кишечника и легкого, содержащие мРНК исследуемых генов. Использовали «гнездовой» вариант ОТ-ПЦР. В первом раунде проводили горячий старт ПЦР. На втором этапе проводили ассиметричную ПЦР, совмещенную с флуоресцентным мечением кДНК. Результаты реакции оценивали методами электрофореза нуклеиновых кислот или гибридизацией на биочипе.

**Результаты и выводы.** При использовании условий реакции, применяемых для стандартной ОТ-ПЦР, на стадии ассиметричной ПЦР наблюдалась отсутствие наработки некоторых продуктов реакции. При использовании набора праймеров, не образующих димеры между собой, результаты реакции также не удовлетворяли требуемым условиям. Наилучшие результаты наблюдались, когда амплифицируемые фрагменты были близки по размеру друг к другу. В итоге была разработана мультиплексная ПЦР для выявления мРНК 16 раково-тестикулярных генов с использованием биочипа.

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».*

*Н.А. Плужникова*

#### **ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ ИНТЕГРИНОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФФЕКТОРОВ**

**ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА  
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ  
В РАННЕМ ПОСТОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ**  
*РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

Расширенные хирургические операции у онкологических больных часто сопровождаются развитием системной воспалительной реакции (СВР). Одной из наиболее вероятных причин синдрома СВР является нарушение проницаемости кишечника, способствующая транслокации бактерий и их токсинов в кровяное русло. Бактериальные компоненты посредством Toll-like рецепторов ведут к активации эффекторов врожденного иммунитета, одним из проявлений которой может быть экспрессия молекул адгезии и изменения функциональной активности.

**Цель исследования.** Установление взаимосвязи между уровнями экспрессии молекул интегринов и цитотоксической активности (ЦА) клеток врожденного иммунитета вследствие расширенных хирургических вмешательства у онкологических больных.

**Материалы и методы.** Изучен фенотип лимфоцитов крови 10 онкологических больных до и после (24 ч) хирургического вмешательства; функциональность NK-клеток, а также образцы крови здоровых доноров (ЗД) ( $n=25$ ). Для фенотипирования лейкоцитов использовали антитела к CD11b, CD11c меченные флуорохромами (Vecton Dickinson, USA). Для определения индекса ЦА (ИЦА) NK-клеток использовали модель *in vivo* (мишени-клетки линии K562).

**Результаты.** У онкологических больных до операции уровень экспрессии молекул адгезии CD11b и 11c на лимфоцитах не отличался от ЗД ( $p>0,05$ ). Однако уже через 24 ч после хирургического вмешательства обнаруживается значительное увеличение уровня экспрессии рассматриваемых маркеров лимфоцитов больных CD11b с 47,14 % (33,24–48,45) до 75,1 % (65,47–78,35) и CD11c с 43,95 % (35,42–50,19) до 77,78 % (70,15–80,76) ( $p<0,05$ ). Следует отметить, что в раннем послеоперационном периоде повышалась доля CD45<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> NK с 15,43 % до 25,42 %, при этом содержание CD45<sup>+</sup>3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> NKT-клеток практически не изменялось. Функциональная активность лимфоцитов больных до операции достоверно не отличалась от значений ИЦА ЗД ( $p>0,05$ ). После хирургического вмешательства у больных на фоне увеличения содержания лимфоцитов (до 61,46) значительно повышалась и ИЦА.

**Выводы.** Таким образом, можно предположить, что повышенная функциональность эффекторов врожденного иммунитета может быть опосредована повышением уровня экспрессии CD11b и CD11c, что позволяет NK осуществлять контактное взаимодействие с клетками-мишенями.

*Н.А. Пятаев, О.В. Минаева, Г.С. Столяров,  
Н.Н. Зыряева, А.М. Зюзин*

#### **ВЛИЯНИЕ ПУТИ ВВЕДЕНИЯ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ИХ ТКАНЕВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ**

*ГОУ ВПО Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева, Саранск*

Магнитные наночастицы (МНЧ) представляют интерес как средство для направленной доставки химиопрепаратов благодаря возможности управления ими внешним магнитным полем (МП). Вместе с тем, сами наночастицы магнетита в зависимости от химического строения имеют специфические особенности биокинетики и тканевого распределения.

**Цель исследования.** Изучить зависимость тканевого распределения наночастиц магнетита от их пути введения в условиях воздействия внешнего магнитного поля и без него.

**Материалы и методы.** Исследовано тканевое распределение коллоидных наночастиц магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, стабилизированного олеиновой кислотой, у интактных крыс в условиях воздействия внешнего магнитного поля и без него. Животные разделены на 4 группы по 6 особей в каждой. В 1-й и 3-й группах МНЧ вводились внутривенно, во 2-й и 4-й – в сонную артерию (интракаротидно). В 3-й и 4-й группах создавали магнитное поле над областью головы с помощью электромагнита. Определяли концентрацию магнетита крови и гомогенатах органов методом магниторезонансной спектроскопии через 3 ч после введения. Рассчитывали концентрационное соотношение ткань/кровь ( $K_{т/к}$ ).

**Результаты.** При введении МНЧ без воздействия магнитного поля наивысшая их концентрация регистрировалась в органах «первого прохождения» – в легком при внутривенном и в головном

мозге при интракаротидном введении. Отношение концентрации МНЧ в этих тканях к концентрации в крови составило  $3,8\pm 0,2$  (в легком) и  $4,1\pm 0,3$  (в мозге). Для печени, почек, селезенки и кишечника концентрационное отношение ткань/кровь практически не различалось в группах внутривенного и интракаротидного введения, составляя 2,9–3,2, 3,0–3,4 и 0,61–0,83 соответственно.

При внешнем воздействии магнитного поля на область головы концентрационное отношение ткань/плазма в мозге увеличивалось до  $5,5\pm 0,3$  и  $10,8\pm 0,4$  соответственно при внутривенном и интракаротидном введении. При этом сохранялось накопление МНЧ в легких при внутривенном введении ( $K_{т/к} = 2,8\pm 0,2$ ). Значения коэффициента ткань/кровь для других органов практически не менялись, а абсолютные значения плазменной и тканевых концентрации были несколько ниже таковых в сериях без применения МП. Механизм задержки МНЧ в органах «первого пассажа» является предметом изучения.

**Выводы.** При внутривенном и интракаротидном введении магнитных наночастиц интактным животным происходит их аккумуляция в органах «первого пассажа» – легком и головном мозге. Максимально высокая концентрация магнитных наночастиц в ткани головного мозга достигается при их интракаротидном введении в условиях воздействия магнитного поля на область головы.

*Работа выполнена при поддержке гранта Президента молодым кандидатам наук МК-5268.2011.7.*

*С.Ю. Рахметова*

#### **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

*ООО ИнтерЛабСервис, Москва*

В современной онкологии молекулярно-генетические исследования являются неотъемлемой частью диагностики и выбора лечения. Благодаря применению новых методов и диагностических возможностей в области генетики было установлено, что каждая опухоль обладает собственными, присущими только ей характеристиками, которые отличаются от клеток здоровых тканей. На основании этих отличий стала возможной разработка лекарственных препаратов, действующих непосредственно на молекулярную мишень в опухолевой клетке, не повреждая серьезным образом другие органы и ткани пациента. Применение таких препаратов носит название «таргетная терапия». Особенность этой терапии заключается в том, что каждый конкретный препарат эффективен лишь в отношении того типа опухолей, который обладает характеристиками «под которые» данный препарат был разработан. Большое значение имеет также выявление наследственно обусловленных форм рака. Применение новых препаратов, ориентированных на «точечное» воздействие на молекулярные механизмы, требует обязательной идентификации генетических нарушений.

Детекция генетических нарушений методом аллельспецифичной ПЦР в реальном времени (PCR-HRM) при помощи наборов реагентов QIAGEN позволяет относительно быстро проводить детекцию и количественное определение соматических мутаций в генах EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, PI3K, а также выявлять в этих генах новые соматические мутации для определения схемы лечения и контроля эффективности терапии. Метод гарантирует высокую специфичность и чувствительность, позволяя детектировать менее 1 % мутантной ДНК на фоне дикого типа.

Другой актуальный метод количественного определения соматических мутаций в вышеперечисленных генах – пиросеквенирование – определение нуклеотидной последовательности в режиме реального времени, позволяющий детектировать полиморфизмы в гомо- и гетерозиготном состоянии (используются наборы реагентов QIAGEN). Используя метод пиросеквенирования, также можно определять наиболее часто встречающиеся мутации в генах BRCA1 и BRCA2, являющиеся причиной наследственно обусловленного рака молочной железы, яичников, поджелудочной железы, простаты. (BRCA-скрин, пр-во ФГУП ЦНИИ Эпидемиологии).

Применение современных подходов для выявления соматических мутаций в онкогенах и определения генетической предрасположенности к развитию рака позволяет проводить целенаправленное лечение в зависимости от индивидуального генотипа некоторых видов рака.

*В.Д. Румянцева<sup>1</sup>, И.П. Шилов<sup>1</sup>, А.И. Панас<sup>1</sup>, К.С. Шамхалов<sup>2</sup>, А.С. Рябов<sup>2</sup>, А.Ф. Миронов<sup>2</sup>, А.В. Иванов<sup>3</sup>, А.Ю. Барышников<sup>3</sup>*

#### **ПОЛУЧЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОРАЗМЕРНЫХ ИТТЕРБИЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ДИМЕТОКСИГАТОПОРФИРИНА**

<sup>1</sup>Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Фрязинский филиал

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

<sup>3</sup>РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

**Цель исследования.** Синтез и исследование основных фотофизических свойств наноразмерных и нефототоксичных иттербиевых комплексов на основе водорастворимой дикалиевой соли Yb-2,4-диметоксигематопорфирина IX.

**Материалы и методы.** Осуществлен синтез водорастворимой дикалиевой соли Yb-2,4-диметоксигематопорфирина IX. Методом динамического рассеяния света измерено распределение наночастиц Yb-комплексов по размерам в их водных растворах. Для проведения исследований был введен в действие макет лазерного анализатора крови ЛАК-1 (разработка РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва), представляющий собой лазерный корреляционный спектрометр (ЛКС). Изучены также электронные и спектрально-кинетические характеристики комплексов. Измерения спектров поглощения синтезированных комплексов проводили на спектрофлуориметре LS-5B, Perkin Elmer. Изучение люминесцентных и временных характеристик Yb-комплексов осуществлялось на экспериментальном измерительном стробоскопическом стенде, разработанном в ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН. Исследования люминесцентного диагностического контрастного индекса (ЛДКИ) проводились на макетном волоконно-лазерном онкофлуориметре.

Эксперименты осуществлялись на мышасамках линии Balb/C с привитой опухолью Льюиса при дозах препарата на уровне 0,01–10 мг/кг веса. Результаты. Показано, что все синтезированные иттербиевые комплексы на основе 2,4-диметоксигематопорфирина IX обладают узкой и достаточно яркой линией люминесценции, которая находится в диапазоне 975–985 нм, где собственная люминесценция биотканей практически отсутствует. Впервые была обнаружена эмиссионная полоса на 580 нм, которая отсутствует у безметалльных комплексов. Наличие полосы на 580 нм может быть

объяснено тем фактом, что использование в качестве матриц для иона Yb<sup>3+</sup> нелинейных сред (порфириновая матрица) позволяет сдвигать длину волны генерации лазерного излучения в видимую область спектра благодаря самоудвоению и самосмешиванию частот. Установлено также, что среднее время жизни люминесценции для синтезированных нами иттербиевых комплексов на основе водорастворимой дикалиевой соли Yb-2,4-диметоксигематопорфирина IX составляет 5–10 мксек. При этом достигнут высокий уровень ЛДКИ и накопления в опухоли. Было показано, что ЛДКИ опухоль/мышца для этой субстанции при дозах 0,5–1,0 мг/кг достигал значений вплоть до 10,0. Высокое значение селективности накопления данных субстанций может быть связано с размерностью данных комплексов. Измерения на установке ЛАК-1 показали, что более 95 % от общего количества субстанции имеют размер около 5нм, что составляет половину от размера молекулы сывороточного альбумина человека (САЧ), являющегося основным транспортом доставки белков по кровеносным сосудам.

**Выводы.** Осуществлен синтез и изучены основные фотофизические свойства наноразмерных и нефототоксичных иттербиевых комплексов на основе водорастворимой дикалиевой соли Yb-2,4-диметоксигематопорфирина IX. Такие субстанции перспективны для ранней люминесцентной диагностики визуально и эндоскопически доступных форм рака в ИК-диапазоне спектра.

*Е.В. Санарова, Е.В. Игнатьева, И.Г. Меерович, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, З.С. Смирнова, Н.А. Оборотова*

#### **ПАРАМЕТРЫ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛФ ТИОСЕНСА**

*РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

Активное применение липосомальных лекарственных форм в онкологии требует отработки технологий их получения. Одним из препаратов, относящихся к фотосенсибилизаторам второго поколения, является Тиосенс, технология получения липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) которого требует особых условий и методов в связи с его легкой окисляемостью и нерастворимостью в водных растворителях.

**Задачи исследования.** Определить критические параметры технологического процесса получения ЛЛФ Тиосенса.

**Материалы и методы.** Липосомы Тиосенса имели в своем составе лецитин, холестерин и РЕ-PEG-2000 в молярном соотношении 1/0,22/0,002, соотношение лецитин/препарат составило 270/1. Из хлороформного раствора липидов и препарата получали полупрозрачную пленку путем отгона растворителя на роторном испарителе BÜCHI Rotavapor R-200. Затем полученные мультимеллярные везикулы фильтровали через фильтры с размером пор 1,2 мкм, и измельчали на гомогенизаторе высокого давления Microfluidizer M-110S. После измельчения проводили стерилизующую фильтрацию (размер пор фильтра 0,22 мкм) для отделения невключившегося препарата. К полученной липосомальной дисперсии добавляли раствор сахарозы (криопротектор) в массовом соотношении лецитин/сахароза 1/9 и подвергали лиофилизации.

**Результаты и выводы.** Было выяснено, что на ЛЛФ в большей степени оказывает влияние качество используемого лецитина; температура получе-

ния липидной пленки и величина вакуума при ее сушке; рН и средний размер везикул липосомальной дисперсии; продолжительность (количество циклов) гомогенизации; уровень окисленности липосомальных фосфолипидов и рН измельченной ЛЛФ. Существенным фактором является введение криопротектора и лиофилизация ЛЛФ, при этом также необходимо учитывать химическую структуру криопротектора, его концентрацию и подобрать оптимальный режим лиофильной сушки с учетом физико-химических свойств препарата.

*Работа выполнена в рамках научно-технической программы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний» при финансовой поддержке Правительства г. Москвы.*

*Е.В. Санарова<sup>1</sup>, Е.А. Котова<sup>1</sup>, А.П. Полозкова<sup>1</sup>,  
Е.В. Игнатьева<sup>1</sup>, А.В. Ланцова<sup>1</sup>, Т.В. Денисова<sup>2</sup>,  
И.И. Краснюк<sup>2</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1</sup>*

#### **ИНДЕКС ОКИСЛЕННОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ НА СТАДИЯХ**

#### **ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА**

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

<sup>2</sup>ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Важным параметром качества фосфолипидов липосом является индекс окисленности (ИО), который соответствует содержанию конъюгированных диенов, образующихся в результате перекисного определения липидов.

**Задачи исследования.** Определить тенденцию изменения ИО липосомальных фосфолипидов в течение технологического процесса.

**Материалы и методы.** Большие многослойные липосомы (БМЛ) содержали лецитин, холестерин, ПЭГ-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин в молярном соотношении 165:8:1, а в состав с антиоксидантом (АО) добавляли 13 мг 10% масляного раствора  $\alpha$ -токоферола ацетата. После получения липидной пленки ее гидратировали 150 мМ раствором натрия хлорида. Эмульсии БМЛ фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм, а для получения однослойных липосом применяли три метода – экструзию, измельчение УЗ и гомогенизацию. ИО оценивали разведением 0,1 мл анализируемого образца липосом 10 мл 95% этанола и измерением оптической плотности спиртового разведения при длинах волн 215, 233, 300 нм.

**Результаты.** При использовании гомогенизации с целью получения однослойных липосом значения ИО пустых липосом (0,31) и пустых липосом с АО (0,26) увеличивались в 2–2,5 раза относительно БМЛ (0,13). Лиофилизация пустых липосом (ПЛ) вызывала увеличение показателей ИО для обоих типов липосом, причем для ПЛ до 0,35, а для пустых липосом с АО до 0,33. ИО ФЛ в экструдированных липосомах до и после лиофилизации различался незначительно, а присутствие АО практически не вызывало снижения значений ИО. При оценке окисленности ПЛ, измельченных УЗ, выяснено, что до лиофилизации ИО имел значение 0,34, а после – 0,46. Для ПЛ с АО значения ИО до (0,32) и после лиофилизации (0,42) также ощутимо отличались.

**Выводы.** Применение УЗ для измельчения липосом нецелесообразно в связи с резким увеличением ИО липосомальных фосфолипидов. Экструзия позволяет сохранить низкие показатели ИО, но применение ее в промышленных масштабах нерентабельно, поэтому для получения больших объемов липо-

сом применяют гомогенизацию, обеспечивающую допустимое содержание конъюгированных диенов в липосомах. Использование витамина Е в качестве АО не обеспечивает значительного снижения ИО.

*Н.А. Сахарнов<sup>1</sup>, О.В. Уткин<sup>1,2</sup>, Д.В. Новиков<sup>1</sup>,  
Е.Ю. Конторщикова<sup>3</sup>, В.В. Новиков<sup>1</sup>*

#### **ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АРО-1 В КЛЕТКАХ КРОВИ И ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГОВ БОЛЬНЫХ МИОМОЙ МАТКИ**

<sup>1</sup>НИИ молекулярной биологии и региональной экологии ННГУ имени Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

<sup>2</sup>Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород

<sup>3</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

**Цель исследования.** Оценка спектра альтернативных форм мРНК Fas в клетках периферической крови и клеток опухолевого очага при миоме матки.

**Материалы и методы.** Исследовалось 11 образцов периферической крови и 17 образцов клеток опухолевых очагов больных с цитологически и гистологически подтвержденным диагнозом миомы матки, проходивших стационарное лечение в гинекологической клинике Областной больницы им. Н.А. Семашко г. Нижнего Новгорода. Матричную РНК Fas-антигена детектировали методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к местам соединения экзона пре-мРНК Fas-антигена.

**Результаты и выводы.** В клетках крови и опухолевых очагов в различных сочетаниях было выявлено 6 альтернативных форм мРНК Fas-антигена, организованных в 6 и 8 спектров соответственно. В клетках периферической крови матричная РНК мембранной формы Fas-антигена детектировалась в 100 % случаев. Матричная РНК доминирующей растворимой формы Fas-рецептора с делецией 6 экзона обнаруживалась в 72,7 % случаев, матричные РНК четырех минорных форм с делециями 3, 4 и 6 экзона в различных сочетаниях выявлялись с частотой от 9 до 54,5 % случаев. В клетках опухолевых очагов матричная РНК как мембранной, так и доминирующей растворимой формы Fas-антигена детектировались в 58,8 % случаев, матричные РНК двух минорных форм с делециями 3, 4 и 6 экзона в различных сочетаниях встречались с частотой от 11,7 до 17,6 % случаев. В 29,4 % образцов клеток опухолевых очагов миомы матки не было выявлено ни одной альтернативной формы мРНК Fas-антигена. При этом в образцах крови этих доноров мРНК Fas выявлялась. Отсутствие мРНК mFas в клетках опухолевых очагов может являться одной из возможных причин опухолевого роста вследствие ингибирования апоптоза.

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».*

*Ю.В. Стукалов, Е.Ю. Колдаева,  
Е.Л. Кадырова, Е.Ю. Григорьева*

#### **ТОКСИКОЛОГИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ НАНОКОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

В настоящее время перспективным направлением в терапии онкологических заболеваний считается таргетная радиоиммунотерапия.

Радиофармпрепараты нового поколения характеризуются высокой эффективностью, клинической и радиационной безопасностью. Такими свойствами, например, обладают препараты на основе дендримеров, которые могут стать универсальной системой доставки альфа- и бета-радионуклидов. Нами предлагается в качестве препаратов для таргетной терапии злокачественных новообразований использовать конструкции на основе синтезированных дендримеров. Дендримеры – новый класс синтетических молекул размером до 10 нм. Внешний слой дендримера модифицируется для контроля препарата, гидрофобности ядра и прицельной доставки конструкции внутрь или на поверхность опухолевых клеток. Были разработаны схемы синтеза дендронов окислительно-восстановительных дендримеров нового класса на основе гидрохинонов и проведена их оптимизация. Кроме того, разработаны способы дивергентной и конвергентной сборки таких дендримеров, а также конструкций вышеупомянутых дендримеров с опухолеспецифичными агентами, например, моноклональными антителами.

**Цель исследования.** Определение острой токсичности полученных наноконструкций.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на мышах линии Balb/c; испытывали дозы в интервале от 150 до 1500 мг/кг массы тела. Параметры токсикометрии определяли по методу Кербера.

**Результаты и выводы.** Параметры токсикометрии для дендримеров нового класса разного химического строения составляют: порог острого действия ( $Lim_{ac}$ ) – 125 ÷ 275 мг/кг массы тела; максимально переносимая доза (МПД) – 140 ÷ 330 мг/кг массы тела; абсолютно смертельная доза ( $LD_{100}$ ) – 411 ÷ 750 мг/кг массы тела; средне смертельная доза ( $LD_{50}$ ) – 210 ÷ 480 мг/кг массы тела. Таким образом, зона острого токсического действия позволяет использовать данные соединения для создания препаратов-носителей для таргетной терапии онкологических заболеваний.

*И.В. Федосов<sup>1</sup>, Б.Н. Хлебцов<sup>2</sup>, А.Н. Якунин<sup>3</sup>, Ю.А. Аветисян<sup>3</sup>, В.В. Тучин<sup>1,3</sup>*

#### ЛОКАЛЬНЫЕ ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ЭФФЕКТЫ НА СУБКЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНЫХ ПУЧКОВ С ПЛАЗМОННЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

<sup>3</sup>Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов

**Задачи исследования.** Терапевтическое действие лазерного излучения неразрывно связано с процессом гипертермии биотканей, который может являться как основным, так и сопровождающим эффектом. Точная локализация лазер-индуцированной гипертермии возможна путем введения в ткани плазмонно-резонансных частиц благородных металлов, которые сильно поглощают лазерное излучение и преобразуют его в тепловую энергию, нагреваясь до значительной температуры. Оптимизация метода лазер-индуцированной гипертермии требует детального изучения механизмов локального переноса тепловой энергии от наночастиц к окружающим их тканям на субклеточном уровне.

**Материалы и методы.** Объектом исследования было тепловое поле вблизи наночастицы, помещенной в однородную среду и освещенной пучком

лазерного излучения, а также тепловое поле, создаваемое ансамблем частиц в этой среде. Данные тепловые поля моделировались на основе численных и аналитических решений нестационарного уравнения теплопроводности. Экспериментальное изучение температурных полей осуществлялось методом динамической ультрамикроскопии коллоидных наночастиц. Данный метод заключается в регистрации серии изображения наночастиц в коллоидном растворе при помощи светового ультрамикроскопа. Последующая цифровая обработка серии изображений позволяет оценить параметры теплового (броуновского) и направленного движения наночастиц в пучке лазерного излучения.

**Результаты и выводы.** В результате нами были оценены профили распределения температуры наночастиц в поперечном сечении лазерного пучка с пространственным разрешением около 1 мкм. Установлено, что нагрев наночастицы не приводит к значительному повышению интенсивности ее теплового движения в жидкости, что может быть вызвано наличием на поверхности наночастицы также молекул стабилизирующего агента. Показана необходимость учета броуновского и направленного движения наночастиц в поле лазерного пучка при оценке эффективности теплопереноса от частицы к среде.

*Н.Г. Хлебцов<sup>1,2</sup>, Л.А. Дыкман<sup>1</sup>, Б.Н. Хлебцов<sup>1</sup>, Е.В. Панфилова<sup>1</sup>, В.А. Ханадеев<sup>1</sup>, В.А. Богатырев<sup>1</sup>, Г.С. Терентьев<sup>1</sup>, Е.С. Тучина<sup>2</sup>, В.В. Тучин<sup>2</sup>, В.Д. Румянцев<sup>3</sup>, А.В. Иванов<sup>4</sup>*

#### БИМЕДИЦИНСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЗОЛОТЫХ И КОМПОЗИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

<sup>3</sup>МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>4</sup>РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Функционализированные золотые наночастицы с контролируемыми геометрическими и оптическими свойствами являются объектом интенсивных исследований и биомедицинских применений, включая геномику, биосенсорику, иммуноанализ, клиническую химию, лазерную фототерапию раковых клеток и опухолей, адресную доставку лекарств, ДНК и антигенов, оптический биоимиджинг и мониторинг клеток и тканей с применением современных систем регистрации. Эти приложения основаны на комбинировании двух принципов: 1) функционализации поверхности для обеспечения коллоидной стабильности и биосовместимости частиц, молекулярного узнавания конъюгатов, эффективности эндоцитоза и т.п.; 2) возбуждении плазмонных резонансов в видимой или ближней ИК области для получения уникальных оптических свойств. В работе дан обзор полученных к настоящему моменту результатов и актуальных проблем в области биомедицинских приложений золотых наночастиц различного размера, формы и структуры. Основное внимание уделено применению конъюгатов золотых наночастиц с различными молекулами-зондами в биомедицинской диагностике и аналитике, фототермальной и фотодинамической терапии, в качестве носителей целевых молекул, а также иммунологическим, токсикологическим и антимикробным свойствам. Приведены примеры различных плазмонно-резонансных и композитных

наночастиц, синтезируемых в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН. Обсуждаются возможности контролируемого дизайна наноструктур с требуемыми оптическими, фототермическими и фотодинамическими свойствами. В частности, рассматриваются новые типы мультифункциональных композитных наночастиц для терапии и диагностики, которые имеют потенциальные свойства фототермального нагрева, видимой флуоресценции и ИК-люминесценции, а также фотодинамической активности за счет включения фотосенсибилизатора в структуру наночастиц.

*Н.А. Цыганова<sup>1</sup>, М.В. Рыжова<sup>1</sup>, Р.В. Никифоров<sup>1</sup>, Г.С. Терентюк<sup>2</sup>, Н.Г.Хлебцов<sup>2</sup>, Р.М. Хайруллин<sup>1</sup>*

**ПРОНИЦАЕМОСТЬ  
ГЕМАТО-ПЛАЦЕНТАРНОГО БАРЬЕРА  
БЕЛЫХ КРЫС  
ДЛЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ**

<sup>1</sup>Ульяновский государственный университет, Ульяновск

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

**Задачи исследования.** Изучение степени проницаемости гемато-плацентарного барьера (ГПБ) белых крыс при внутривенном введении золотых наночастиц (ЗНЧ), а также изучение их токсического действия на материнский организм и плод.

**Материалы и методы.** Эксперимент проведен на самках белых крыс в стандартных условиях вивария. В хвостовую вену беременным крысам на I стадии становления гемохориальной плаценты (11–15 сутки гестации) вводили 1,5 мл суспензии ЗНЧ диаметром 30 нм двукратно через сутки. Контрольной группе беременных самок вводили физраствор аналогичного объема по описанной схеме. Через сутки после второго введения ЗНЧ или физраствора животных выводили из эксперимента. Морфологические изменения оценивали в печени, почках, селезенке и головном мозге самок и эмбрионов.

**Результаты.** Методом ААС установлено, что после внутривенного введения ЗНЧ в основном накапливаются в печени и селезенке беременной самки. ГПБ оказывается проницаемым для ЗНЧ диаметром 30 нм – содержание золота в эмбрионах экспериментальных животных превышает таковое в эмбрионах контрольной группы. Введение суспензии ЗНЧ диаметром 30 нм не вызывает существенных отклонений в морфологии внутренних органов в сравнении с животными контрольной группы. Для животных обеих групп характерны расширенные капилляры почечных клубочков и переполнение их кровью. Полости капсул нефронов животных после введения ЗНЧ практически не определяются. В отдельных клубочках животных контрольной группы отмечаются умеренно расширенные мочевые пространства.

Во многих полях зрения сосуды коркового и мозгового вещества резко расширены, определяется эритростаз, в некоторых – участках гемолиз эритроцитов. Балочная структура печени сохранена у животных обеих групп, гепатоциты нормальной морфологии, в незначительном числе сосудов эритростаз, синусоиды расширены. Нейроциты головного мозга не изменены, сосуды разных калибров расширены, кровенаполнены.

Введение ЗНЧ вызывает полнокровие красной пульпы. Некоторые лимфатические узелки имеют смазанные края, герминативные центры не определяются. Селезенка самок контрольной группы нормального строения.

**Выводы.** Морфология печени, селезенки и головного мозга плодов контрольной группы и плодов, подвергшихся воздействию раствора золотых наночастиц, не имеет существенных различий.

*Е.Г. Чеботарева, Ю.С. Дудакова,*

*М. Саккала, М. Эльбубу*

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ  
СПЛАВА НАНОЧАСТИЦ [Fe Cu Zn]  
НА ОРГАНИЗМ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ  
ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовско-  
го Минздравоохранения, Саратов**

Свойства наночастиц металлов открывают широкие возможности для создания новых эффективных катализаторов, сенсорных систем, препаратов с высокой биологической активностью для применения в различных областях науки.

**Задача исследования.** Изучение активности наночастиц сплава биогенных металлов [Fe Cu Zn]. Размер частиц 50–60 нм.

**Материалы и методы.** Экспериментальная работа выполнена на самцах мышей. Объектом исследования являлся нанопорошок сплава наночастиц [Fe Cu Zn], который вводился мышам в виде суспензии в дозе 10 мг/кг. Анализ биологического действия оценивался на основании изменения биохимических показателей сыворотки крови.

**Результаты и выводы.** В ходе выполненной работы было выявлено, что под влиянием наночастиц сплава металлов происходит увеличение концентрации глюкозы на 160 % и пирувата на 220 %, снижение уровня лактата на 26 %. Увеличение глюкозы в крови может быть обусловлено нарушением или отсутствием выработки инсулина поджелудочной железой (о нарушении состояния данного органа косвенно свидетельствует снижение амилазы в сыворотке крови), возможно также взаимодействие частиц [Fe Cu Zn] с инсулином (например с сульфгидрильными группами) и инактивация гормона. Вследствие голодания клетки активируются процессы глюконеогенеза. Так как фермент ЛДГ под действием наночастиц инактивируется, то превращение молочной кислоты в пируват также снижается, следовательно, ПВК может образоваться только из гликогенных аминокислот, поэтому в организме происходит усиленный распад белков, о чем свидетельствует повышение концентрации белка в крови на 90 % в опытной группе животных и его альбуминовой фракции на 40 % под влиянием исследуемых наночастиц.

Активные процессы катаболизма белков приводят к образованию конечных продуктов, например креатинина, концентрация которого в экспериментальной группе животных увеличена на 25 % по сравнению с контролем. Уровень мочевины, напротив, снижен на 140 % по сравнению с результатами группы интактных мышей, что может быть обусловлено ингибирующим действием наночастиц [Fe Cu Zn] на ферменты орнитинового цикла.

*А.Н. Шевченко, В.А. Сергань*

**НЕПОСРЕДСТВЕННЫЕ  
РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ  
БОЛЬНЫХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ  
ГОРМОНЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ  
РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*ФГУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздравоохранения России, Ростов-на-Дону*

**Задача исследования.** Оценка эффективности применения аутогемохимиотерапии у больных анд-

рогенчувствительным раком простаты с метастатическим поражением костей.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 50 больных гормоночувствительной аденокарциномой простаты T3bN0M1b, составивших 2 группы. В I группу включены 25 пациентов (средний возраст  $69 \pm 2,4$  лет), получающих бикалутамид (разовая доза 50 мг, курсовая 7500 мг), золедроновую кислоту (разовая доза 4 мг, курсовая 16 мг), многокурсовую аутогемохимioterapia с доцетакселом (разовая доза 80 мг, курсовая 400 мг) и хирургическую кастрацию.

Во II группу – 25 пациентов (средний возраст  $69 \pm 2,1$  лет), получающих бикалутамид (разовая доза 50 мг, курсовая 7500 мг), золедроновую кислоту (разовая доза 4 мг, курсовая 16 мг), хирургическую кастрацию.

Длительность исследования составила 5 мес. Оценку эффективности режимов лечения пациентов обеих групп проводили на основании динамики клинических симптомов с учетом анализа уровней простатоспецифического антигена (PSA) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, рентгенологических методов обследования: СРКТ органов брюшной полости и малого таза, остеосцинтиграфии; для объективизации результатов лечения так же проводился протеомный анализ плазмы крови на основе масс-спектрометрического детектирования (MALDI-TOF-MS Autoflex II, Bruker, США) и идентификации белков в базе Mascot.

**Результаты.** До начала терапии симптомы в обеих группах были сопоставимы.

В процессе лечения в основной группе пациентов отмечалось более выраженное снижение уровня ПСА, уменьшение затруднения и болей при мочеиспускании, болей в костях, улучшение общего состояния сна, аппетита.

В контрольной группе у 3 пациентов в процессе наблюдения появились новые очаги метастатического поражения костей, наблюдалось увеличение объема метастазов, выявленных до начала лечения.

**Выводы.** Таким образом, включение в схему терапии больных диссеминированным гормонозависимым раком простаты с метастатическим поражением костей аутогемохимioterapia доцетакселом позволило улучшить непосредственные результаты лечения этой категории больных.

Г.М. Шуб<sup>1</sup>, О.Г. Шаповал<sup>1</sup>, В.В. Алипов<sup>1</sup>, С.Ю. Доронин<sup>2</sup>, Р.К. Чернова<sup>2</sup>

#### ВЛИЯНИЕ

#### УЛЬТРАДИСПЕРСНОГО ПОРОШКА МЕДИ НА ДИНАМИКУ РАЗВИТИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

**Задачи исследования.** Оценка влияния ультрадисперсного порошка меди на динамику развития популяций штаммов S.aureus, которые являются основными возбудителями бактериемий и инфекций мягких тканей у онкологических больных.

**Материалы и методы.** В работе использованы 5 штаммов S.aureus: стандартный – S.aureus ATCC 6538-R и 4 клинических, выделенных от больных гнойно-воспалительными заболеваниями (один из них был устойчив к ампициллину – минимальная ингибирующая концентрация 6 мкг/мл). Опытные штаммы культивировали в мясо-пептонном бульоне, содержащем ультрадисперсный порошок меди в концентрации 1мг/мл, ампициллин в субингибирующих концентрациях (1/2 минимальной ингибирующей концентрации), а также их сочетания друг с другом. Микробная нагрузка составила  $10^5$  м.т./мл по стандарту мутности McFarland. Сразу, через 3 и 7 ч после посева делали мерный высеv по 0,1мл на мясо-пептонный агар и, исходя из числа выросших колоний, рассчитывали общее количество клеток в 1 мл (п). Ультрадисперсный порошок меди (с размерами кластерных частиц от 40 до 250 нм) получали термоллизом оксалата меди, синтезированного из  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  и  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , в токе  $\text{CO}_2$ .

**Результаты и выводы.** Установлено, что сразу после посева п всех опытных штаммов существенно не отличались и соответствовали микробной нагрузке. Через 3 и 7 ч после посева этот показатель был достоверно ниже по сравнению с контрольными значениями у 2 клинических штаммов (в том числе устойчивого к ампициллину) при культивировании в сочетании антибиотика и ультрадисперсного порошка меди. У остальных штаммов во всех условиях культивирования значения п существенно не отличались. Таким образом, синтезированный нами ультрадисперсный порошок меди оказывает потенцирующее влияние на антимикробную активность ампициллина, однако оно штаммоспецифично.

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



## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АОС – антиоксидантная система	НО – нанооболочки
АЛК – 5-аминолевулиновая кислота ( $\delta$ -aminolevulinic acid)	НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества
АФК – активные формы кислорода	НПТ – наилучшая поддерживающая терапия
АЛС – антилимфоцитарная сыворотка	НСф – наносферы
АТГ – антиtimoцитарный глобулин	НСт – наностержни
АТК – аденокарцинома толстой кишки	НСПВС – нестероидные противовоспалительные средства
БПВП – базисные противовоспалительные препараты	НХЛ – неходжкинская лимфома
БКС – бинарная каталитическая система	НЭ – нуклеиновый эквивалент
ВКМ – внеклеточный матрикс	ОБО – объективный ответ
ВРПС – водорастворимые полисахариды	ОДС – оптическая диффузионная спектроскопия
ВМ – васкулогенная мимикрия	ОО – отсутствие ответа
ВЧД – внутричерепное давление	ОКТ – оптическая когерентная томография
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография	ОЦ – окисленный целлюлоз
ВЭФР-А – васкулоэндотелиальный фактор роста-А	ОЦК – объем циркулирующей крови
в/б – внутрибрюшинно	ОП – опухолевой плеврит
в/в – внутривенно	ОМ – опухолеассоциированные маркеры
ГДА – гистоновая деацетилаза	ОЭ – объективный эффект
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа	РМЖ – рак молочной железы
ГИСО – гастроинтестинальные стромальные опухоли	МР РМЖ – местнораспространенный
ГИБП – генно-инженерные биологические препараты	рак молочной железы
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома	ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма
бГК – быстрорастущая дедифференцированная	рака молочной железы
гепатоцеллюлярная карцинома	
мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная	
карцинома	
ГПВ/GPV – гликопептидная противоопухолевая вакцина	РЭС – ретикулоэндотелиальная система
(glycopeptide cancer vaccine)	ПАВ – поверхностно активные вещества
ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия	ПВП – поливинилпирролидон
предстательной железы	ПД – пролиферация и дифференцировка
Докс – Доксорубин	ПЖЖ – поджелудочная железа
ИК Докс – иммунолипосомальных конструкций с	ПЗ – прогрессирование заболевания
доксорубином	ПО – полный ответ
ДРС – динамическое рассеяние света	ПОПР – полиоксипропилен
ДМБА – диметил- $\alpha$ -бензантрацена	ПС – плевросклерозирующие средства
ДМТ – ДНК-метилтрансфераз	ПСА – простатический специфический антиген
ДЛФО – теория Дерягина – Ландау – Фервея – Овербека	ПСАсв – простатический специфический антиген,
ДК – диеновые конъюгаты	свободная форма
ДЭС – двойной электрический слой	ПСАобщ – простатический специфический
ЗНО – злокачественные новообразования	антиген, общая форма
ЗО – злокачественное образование	%ПСАсв – соотношение свободной формы ПСА
ЗХВК – золотохлористоводородная кислота	к общей, выраженное в процентах
ИДМ – иммунодефицитные мыши	ПТПГ – паратиреоидоподобный гормон
ИК – иммунолипосомальные конструкции	ПФОС – перфторорганические соединения
ИФН- $\gamma$ – интерферон гамма	ППК – первичные половые клетки
ЛТ – лучевая терапия	ПК – периферическая кровь
ЛЛЛФ – лиофилизированной липосомальной ЛФ	ПКГШ – плоскоклеточная карцинома головы и шеи
МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы	ПХТ – полихимиотерапия
МДС – миелодиспластический синдром	ПЭГ – полиэтиленгликоль
МВДП – медиана времени до прогрессирования	ПЯ – палочкоядерный
МИБТ – медицинские иммунобиологические препараты	КРР – колоректальный рак
МЛ – мононуклеарные лейкоциты	КРО – контроль роста опухоли
ММ – метамиелоцит(ы)	КЗ – коллоидное золото
МКА – моноклональные антитела	ИРО – индекс роста опухоли
ММ – множественная миелома	ИФА - иммуноферментный анализ
МОВ – медиана общей выживаемости	ИЭ – индекс эффективности
МРЛ – мелкоклеточный рак легкого	КЭР – кардиоэзофагеальный рак
ММП – матриксные металлопротеиназы	РА – ревматоидный артрит
МРТ – магнитно-резонансная томография	РСО – раствор стандартного образца
НАД – никотинамидадениндинуклеотид	РКТ – рентгеновская компьютерная томография
НК – натуральные киллеры	РЛ – рак легкого
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого	РМП – рак мочевого пузыря
	РМЖ – рак молочной железы
	РПК – рак прямой кишки

РПЖ – рак поджелудочной железы  
PCO – рабочий стандартный образец  
РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов  
РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками  
РФ – ревматоидный фактор  
РФр – растворимые углеводные фракции  
НФр – нерастворимые углеводные фракции  
РЧА – эффективность радиочастотной абляции  
РШМ – рак шейки матки  
СЗП – свежезамороженная плазма  
СО – суперинвазионный описторхоз  
СПС – сосудисто-подобные структуры  
СПЖ – средняя продолжительность жизни  
СЯ – сегментоядерный  
ТИМП – тканевые ингибиторы  
ТСХ – тонкослойная хроматография  
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия  
ТЭОС – тетраэтилортосиликата  
ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка  
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография  
ФГА – фитогемагглютинин  
ФД – флуоресцентная диагностика  
ФР – факторы роста  
ФС – фотосенс  
ФСБ – фосфатно-солевой буфер  
ФСП – фармакопейная статья предприятия  
ФТ – фарнезил-трансфераза  
ФТС – фетальная телячья сыворотка  
ХГ – хорионический гонадотропин  
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз  
ХТ – химиотерапия  
ЛСП – лимфосаркома Плисса  
ЦП – церулоплазмин  
ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид  
ЦФ – циклофосфан  
ЧО – частичный ответ  
ШМ – шейка матки  
ШО – шиффовые основания  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота  
ЭФР – эпидермальный фактор роста  
ЭК – эндотелиальные клетки  
ЭМ – электронная микроскопия  
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

---

%fPSA – fPSA/tPSA  
Akt – протеинкиназа B  
ADMET – drug administration, distribution, metabolism, excretion, and toxicological studies  
ASCUS – atypical squamous cells of undetermined significance  
AUC – Area Under the Curve  
BDFI – bioactivity-directed fractionation and isolation  
c-Kit – рецептор фактора стволовых клеток  
CFSE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester  
CIN – cervical intraepithelial neoplasia (цервикальные интраэпителиальные неоплазии)  
COX – циклооксигеназа  
CRC – colorectal cancer  
EGFR – рецептор эпидермального фактора роста  
EPCAM – adhesion molecule of epithelial cells  
EPR effect – enhanced permeability and retention effect (эффект повышения проницаемости и удерживания)

EMT – Epithelio-mezenhimal transition  
FLDF – freeze-dried liposomal drug formulation  
FLICE – cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme  
GAP – Good Agricultural Practice  
GMP – Good Manufacturing Practice  
GCP – Good Clinical Practice  
GIST – гастроинтестинальные стромальные опухоли  
IC<sub>50</sub> – 50% -ной ингибирующей концентрации ( )  
LDCI – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingardon  
LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюис)  
LSIL – low-grade intraepithelial lesions  
MNNG – N-methyl-N<sup>1</sup>-nitro-N-nitrosoguanidine  
mTOR – мишень рапамицина в клетках млекопитающих  
Mw – molecular weight (молекулярный вес)  
N-DMNA – N-dimethylnitrosoamine  
NE – nucleic equivalents epitope  
NSE – нейроспецифической энтолазы  
NTA – nitril triacetate acid (нитрилтрехуксусная кислота)  
IGFBP – insulin-like growth factor binding protein  
HER – human epidermal growth factor receptor  
HIF-1 $\alpha$  – индуцируемый гипоксией фактор 1 $\alpha$   
HSIL – high-grade intraepithelial lesions  
HSP90 – hot shock protein (белок теплового шока с ММ ~90 кДа)  
MHC – major hystocompatibility complex  
PARP – поли(АДФ-рибоза) полимеразы  
PCa – prostate cancer  
PDGF – тромбоцитарный фактор роста  
PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста  
PDT – photodynamic therapy  
Pr – проспидин  
PSA – prostate-specific antigen  
tPSA – prostate-specific antigen, total form  
fPSA – prostate-specific antigen, free form  
Ph – филадельфийская хромосома  
Ph<sup>+</sup> – наличие филадельфийской хромосомы  
PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (фосфатидилинозитол 3-киназа)  
RA – rheumatoid arthritis  
RF – rheumatoid factor  
ROC – анализ – Receiver Operating Characteristics curve analysis  
SCCA – антиген плоскоклеточной карциномы  
TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)  
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor  
VM – vasculogenic mimicry

## **К 80-летию со дня рождения М.А. Красновой**

5 декабря 2011 г. исполняется 80 лет Маргарите Андреевне Красновой, посвятившей всю свою трудовую деятельность работе в области фармации.

В 1956 г. М.А. Краснова окончила фармацевтический факультет I Московского ордена Ленина медицинского института имени И.М. Сеченова по специальности провизор. Дальнейший выбор жизненного пути определил научный интерес к химико-фармацевтическому анализу. С февраля 1960 г. по июнь 1973 г. М.А. Краснова работала ассистентом на кафедрах аналитической и фармацевтической химии. За этот период защитила диссертацию и получила степень кандидата фармацевтических наук.

С 1974 г. работала в ВОИЦ АМН СССР. Маргарита Андреевна стала первой заведующей лабораторией химико-фармацевтического анализа, а затем заведующей химико-фармацевтического отдела. С 1990 г. она продолжила научную деятельность в должности ведущего научного сотрудника отделения изучения новых противоопухолевых препаратов НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Деятельность М.А. Красновой была связана с фармацевтическим анализом, разработкой нормативно-технической документации лекарственных препаратов, обеспечением контроля качества новых противоопухолевых лекарств, разработанных и проходящих клинические испытания в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Длительное время М.А. Краснова совмещала свою рабочую деятельность с работой эксперта в Фармакопейном комитете МЗ РФ.

М.А. Краснова является автором около 100 печатных научных работ, 6 патентов, 16 фармакопейных статей на противоопухолевые препараты и «Пособия по фармацевтической химии». Ее научные труды вносят большой вклад в развитие фармации.

Вся научная и общественная деятельность М.А. Красновой связана с активной наставнической работой. Маргарита Андреевна воспитала целое поколение настоящих профессионалов, умеющих преодолевать преграды и решать самые сложные задачи, она – одна из немногих, награжденных Дипломом наставника молодежи ВОИЦ АМН.

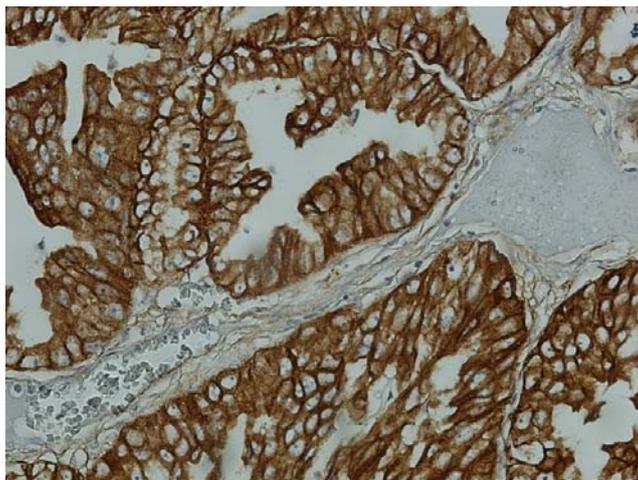
С 2008 г. М.А. Краснова находится на пенсии, однако она по-прежнему живо интересуется работами в области химико-фармацевтического анализа, активно общается с бывшими коллегами и друзьями.

Сотрудники РОНЦ им. Н.Н. Блохина и редакция «Российского биотерапевтического журнала» сердечно поздравляют с 80-летием Маргариту Андреевну, желают ей крепкого здоровья и активного долголетия.

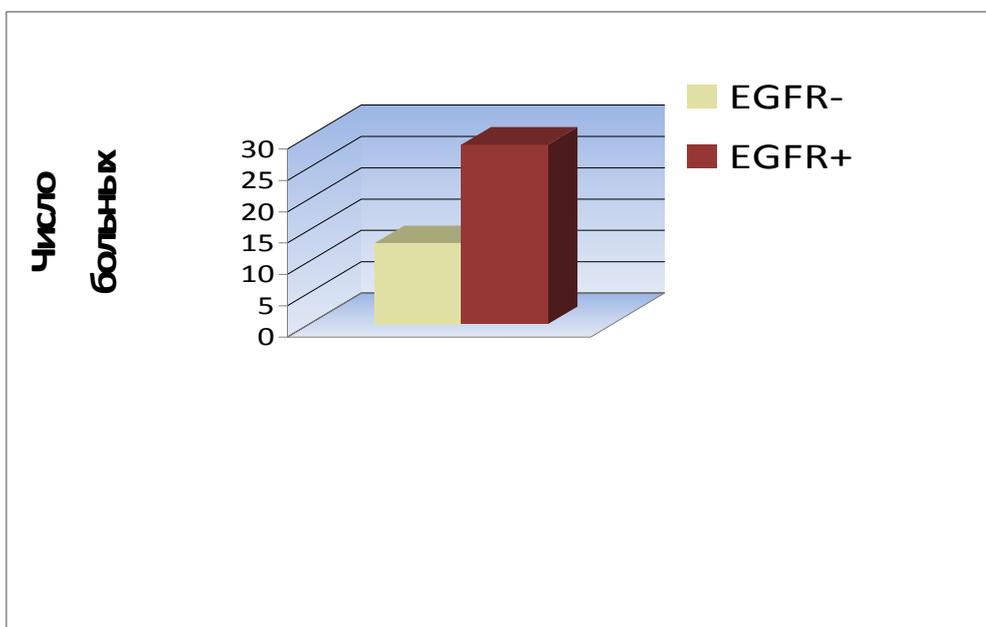


Рисунки к статье *А.А. Коломейцевой, и соавт.*

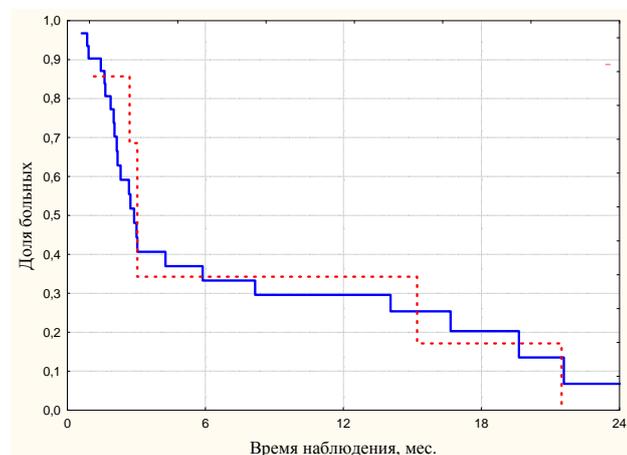
**«ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ  
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА  
У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО»**



**Рис. 1.** Иммуногистохимическое выявление EGFR<sup>+</sup> клеток в опухолевой ткани больных раком легкого (имеют темнокоричневое окрашивание клеточной мембраны; докрасивание гематоксилином). Увеличение ×200.

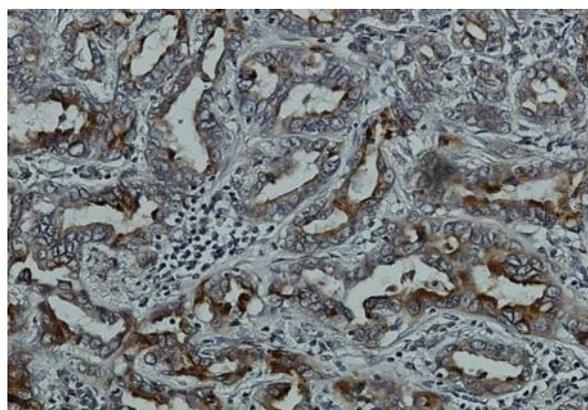


**Рис. 2.** Эффективность терапии больных НМРЛ в зависимости от наличия в опухоли EGFR.



**Рис. 3.** Время до прогрессирования у больных НМРЛ в зависимости от наличия в опухоли EGFR.

EGFR<sup>+</sup>  
EGFR<sup>-</sup>



**Рис. 4.** Иммуногистохимическое выявление pAkt<sup>+</sup> в опухолевой ткани больных раком легкого. pAkt<sup>+</sup> клетки имеют окрашивание цитоплазмы и/или ядер опухолевых клеток. Докрасивание гематоксилином. Увеличение ×200.

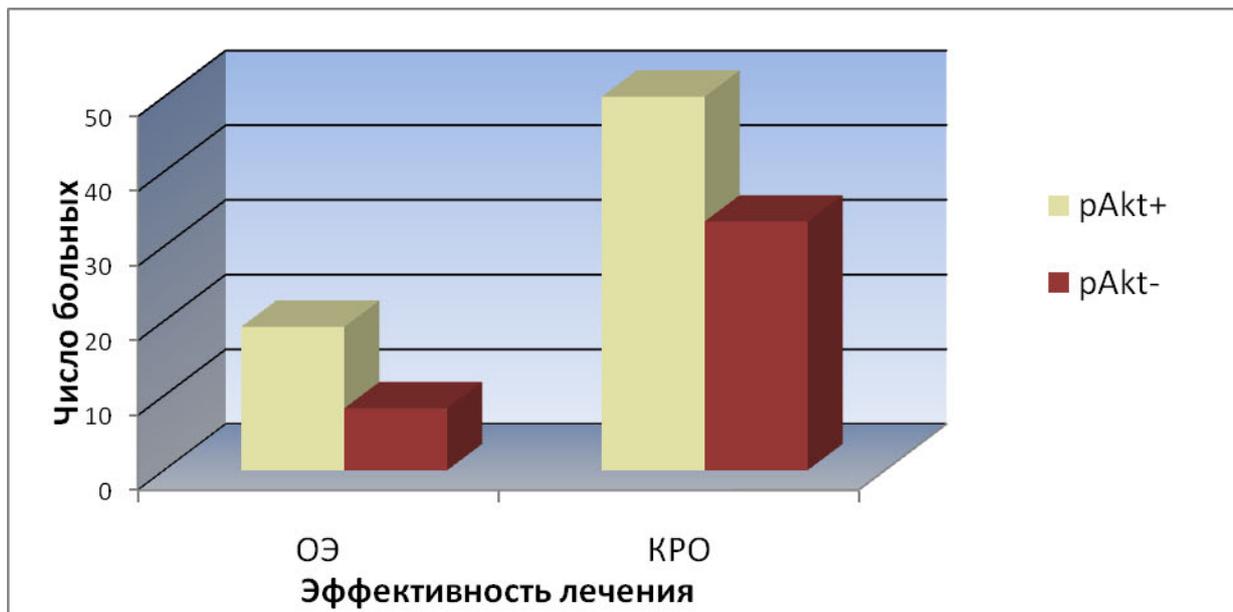


Рис. 5. Эффективность терапии у больных НМРЛ в зависимости от присутствия в опухоли pAkt.

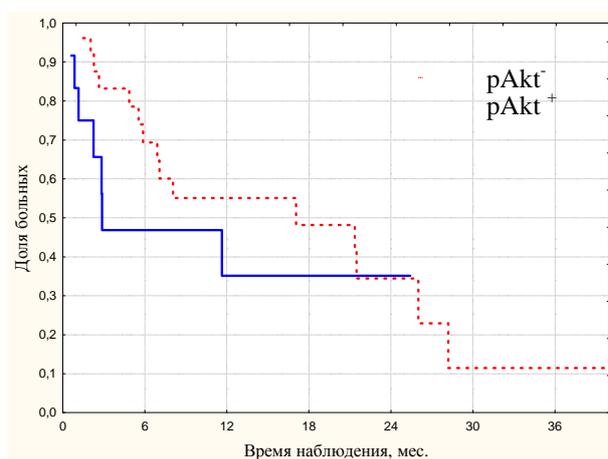
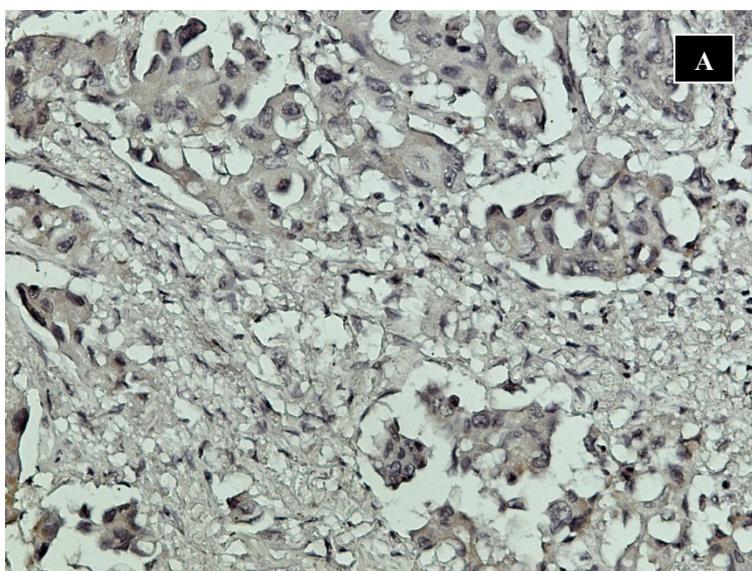
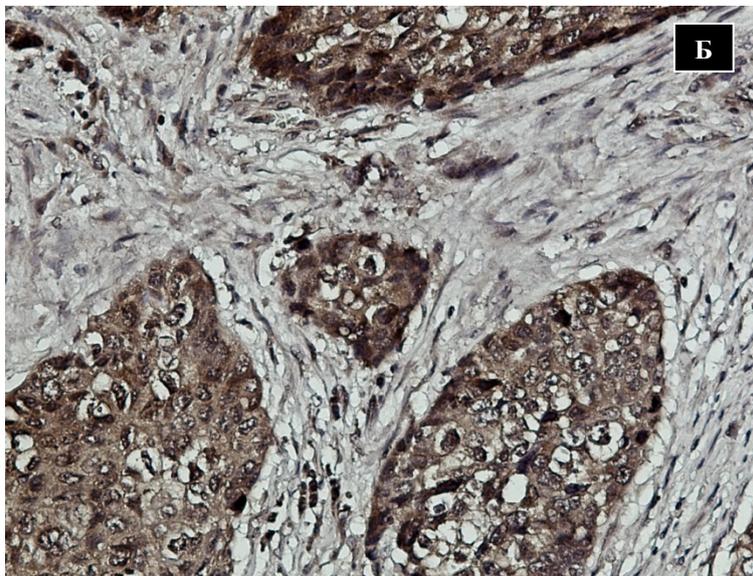


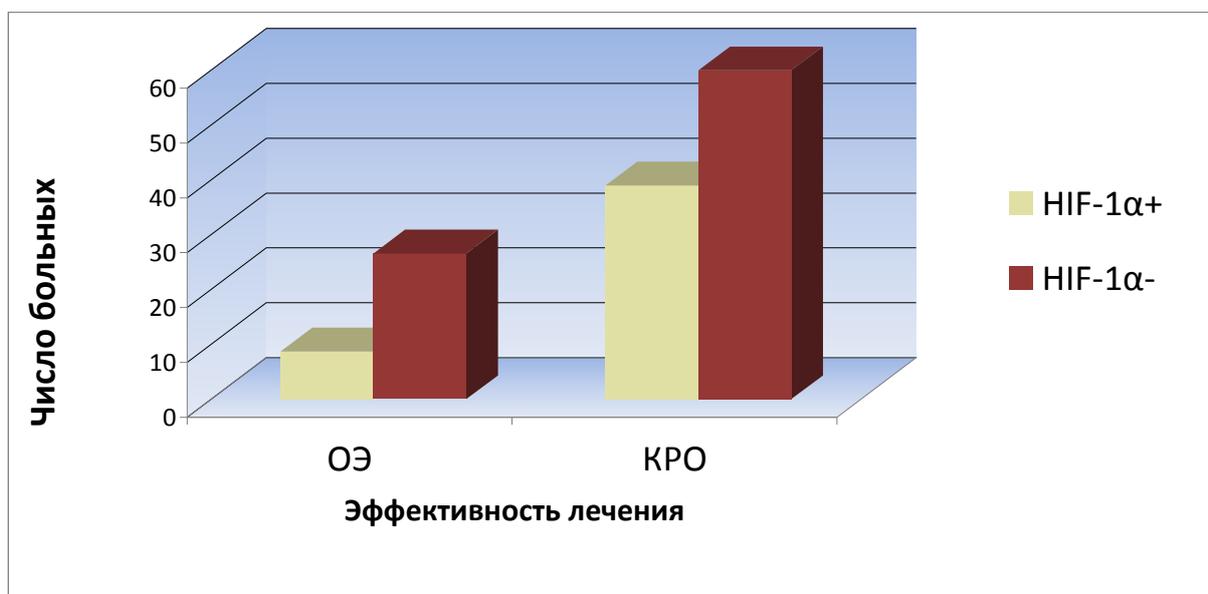
Рис. 6. ОВ больных НМРЛ в зависимости от наличия в опухоли pAkt.



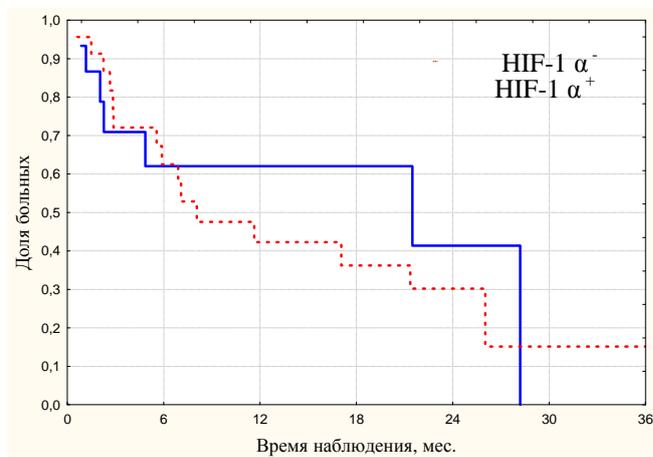


**Рис. 7.** Иммуногистохимическое выявление HIF-1 $\alpha$  в опухолевой ткани больных раком легкого. Докрашивание гематоксилином. Увеличение  $\times 200$ .

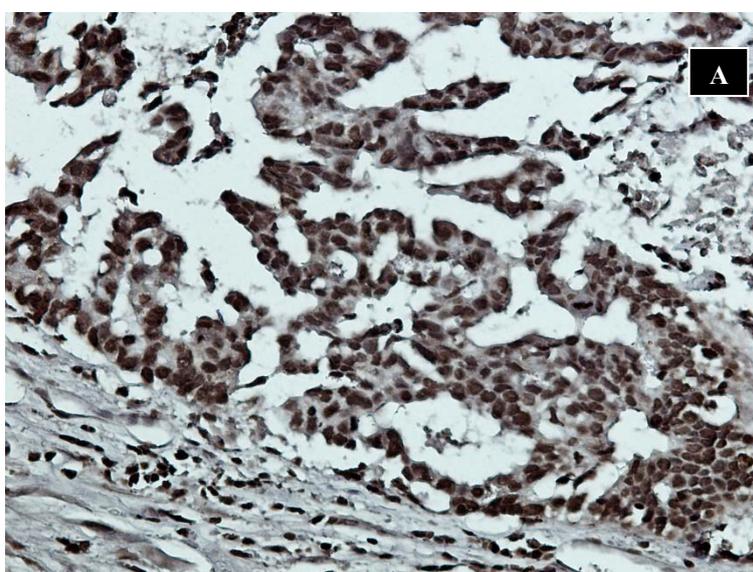
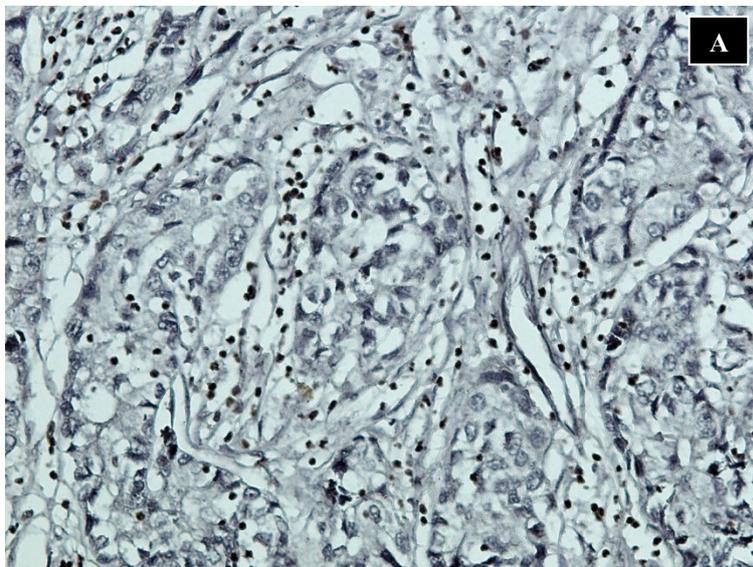
А: Опухолевые клетки HIF-1 $\alpha$ <sup>-</sup>.  
 Б: Опухолевые клетки HIF-1 $\alpha$ <sup>+</sup>.



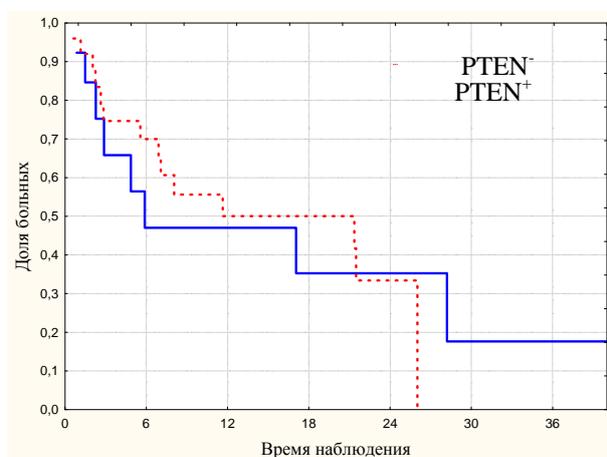
**Рис. 8.** Эффективность терапии у больных НМРЛ в зависимости от присутствия в опухоли HIF-1 $\alpha$ .



**Рис. 9.** ОВ больных НМРЛ в зависимости от наличия в опухоли HIF-1 $\alpha$ .



**Рис. 10.** Иммуногистохимическое выявление PTEN в опухолевой ткани больных раком легкого. Докрашивание гематоксилином. Увеличение  $\times 200$ .  
 А: Опухолевые клетки PTEN<sup>-</sup>.  
 Б: Опухолевые клетки PTEN<sup>+</sup>.



**Рис. 11.** ОВ больных НМРЛ в зависимости от наличия в опухоли PTEN.



Группа компаний «СвитЧайлд» –  
единственный в России представитель крупнейшего  
издательского холдинга «OXFORD PRESS»

**ВПЕРВЫЕ!**  
Русскоязычная версия!

ПРЕДСТАВЛЯЕТ

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ОНКОЛОГИИ Annals of Oncology



Многоотраслевой журнал, публикующий статьи по медицинской онкологии, хирургии, радиотерапии, педиатрической онкологии, а также по лечению и всесторонней поддержке пациентов, имеющих злокачественные опухоли. Официальный журнал Европейского общества медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology) и с 2008 года Японского общества медицинской онкологии (Japanese Society of Medical Oncology).



OXFORD JOURNALS  
OXFORD UNIVERSITY PRESS



Председатель редакционного совета

М.И. Давыдов, президент Российской Академии медицинских наук, академик РАН и РАМН, профессор, директор научно-исследовательского института клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

**ВНИМАНИЕ! ПОДПИСКА!**

тел.: +7 (495) 608-25-45 (доб. 114)

[www.humrep.ru](http://www.humrep.ru)

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

