

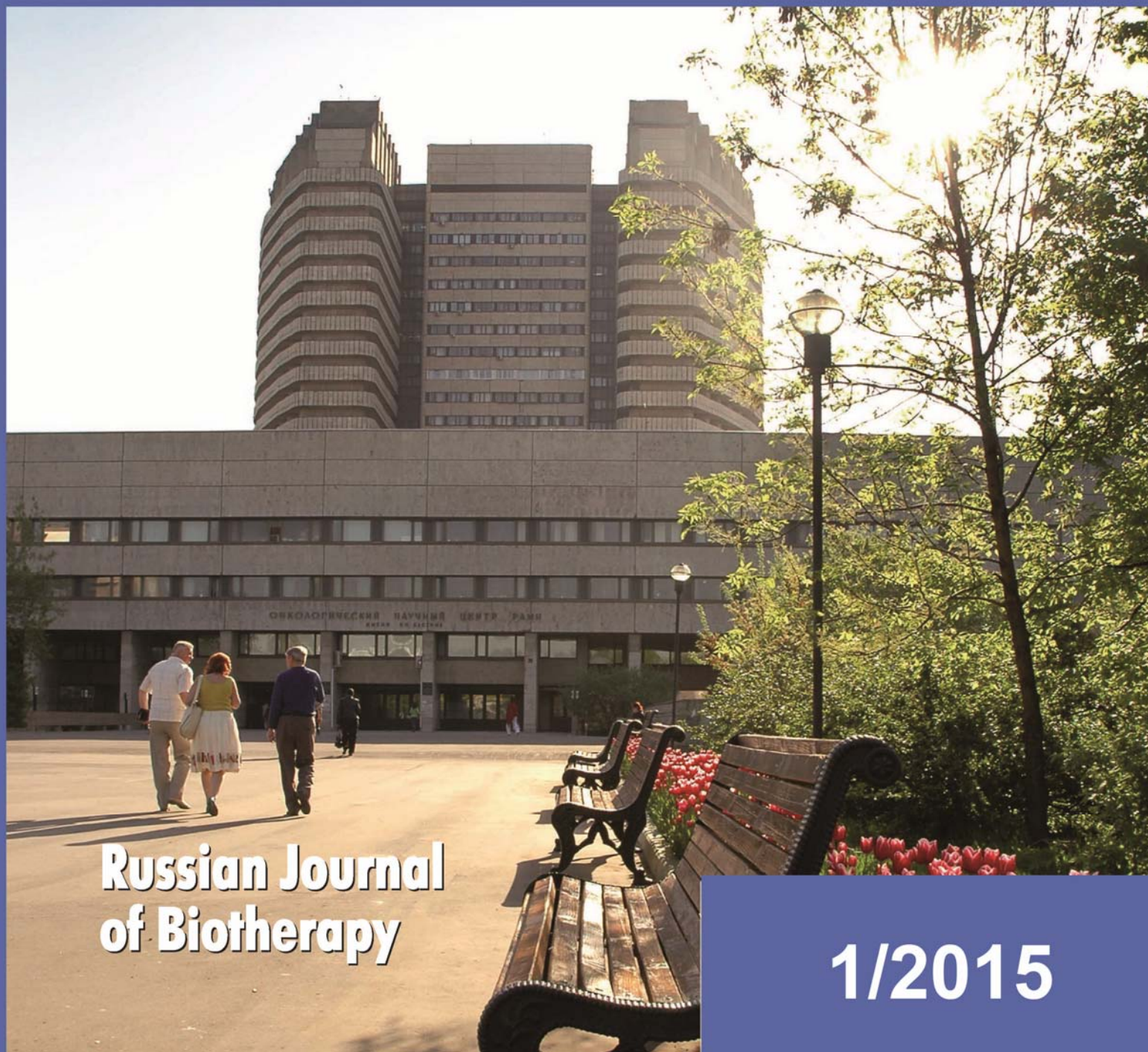


ISSN 1726-9784



# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal  
of Biotherapy

1/2015

ISSN 1726-9784

# РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№1 Том 13 2015 г.

УДК 616-085.2/.3

## Учредители

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

## Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

## Заместители главного редактора

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

## Редколлегия

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

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

## Почтовый адрес:

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

## Подписной индекс 81679

Объем 5 усл.-печ. листов,  
подписано в печать 04.03.2015  
Тираж 1000 экз.

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

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

# СОДЕРЖАНИЕ №1 2015

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

<i>М.А. Барышникова, А.Ю. Барышников</i> <b>МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНЫМИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ</b> .....	3
--	---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>М.В. Оборотова, О.С. Бурова, М.А. Барышникова, Т.Н. Заботина, К.А. Барышников, И.Н. Михайлова, Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, З.Г. Кадагидзе, А.Ю.Барышников</i> <b>ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА</b> .....	11
<i>Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Ю.А. Хоченкова, П.В. Гольшико, Д.А. Хоченков, Е.В. Степанова, О.О. Рябая</i> <b>ЛИПОСОМАЛЬНАЯ АРАНОЗА НЕ ИНДУЦИРУЕТ АУТОФАГИЮ</b> .....	15
<i>П.В. Гольшико, Д.В. Новиков, С.В. Ананьев, К.А. Барышников, В.В. Новиков</i> <b>РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ ГЕНЫ В КРОВИ И ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ</b> .....	19
<i>И.В. Уласов, Н.В.Каверина, А.Ю.Барышников</i> <b>ИНГИБИТОР КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА P53 ПОЗИТИВНО РЕГУЛИРУЕТ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВЕКТОРА В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ</b> .....	25
<i>А.В. Самойлов, Н.М. Сураева</i> <b>ТРАНСФЕКЦИЯ <i>IN VITRO</i> ЭКЗОГЕННОЙ ДНК КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДА КУР</b> .....	29
<i>А.А. Матюшин, О.В. Хугаева, М.А. Барышникова, А.О.Райков, А.Ю. Барышников</i> <b>ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИ-CD5 ИММУНОЛИПОСОМ МИТОКСАНТРОНА <i>IN VITRO</i></b> .....	33
<i>Р.И. Якубовская, А.Д. Плютинская, Е.А. Плотникова, М.А. Грин, А.Ф. Миронов</i> <b>СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>. ПИРОФЕОФОРБИДЫ И ХЛОРИНЫ</b> .....	43
<i>М.А. Каплан, А.И. Малыгина, Г.В. Пономарев, А.А. Михайловская, В.В. Дрожжина, Л.М. Архипова, Ю.С. Осипчук</i> <b>ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ САРКОМЫ М-1 КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА АМИДАМИНХЛОРИНА</b> .....	53
<i>Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»</i> .....	57

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 577.352.2:615.277.3:615.015.44

Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, А.Ю. Барышников

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНЫМИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

#### Контактная информация

Барышникова Мария Анатольевна, к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: [ma\\_ba@mail.ru](mailto:ma_ba@mail.ru)

Статья поступила 02.02.2015, принята к печати 09.02.2015

#### Резюме

Проанализирован механизм индукции гибели клеток липосомальными противоопухолевыми препаратами. Липосомальные лекарственные формы доxorубина, цисплатина и аранозы преодолевают лекарственную устойчивость. Однако механизм преодоления лекарственной устойчивости у этих препаратов разный. Липосомальный доxorубин преодолевает множественную лекарственную устойчивость посредством связывания липосом с Р-гликопротеином в 185 позиции глицина. Липосомальный цисплатин преодолевает монорезистентность активацией генов внешнего апоптоза. Липосомальная араноза не использует CD95/Fas сигнальный путь апоптоза. Таким образом, механизм действия липосомального препарата зависит от типа клеток, от самого противоопухолевого препарата, заключенного в липосому, и может быть индивидуален в каждом конкретном случае.

**Ключевые слова:** множественная лекарственная устойчивость, противоопухолевые препараты, липосомы.

D.A. Afanasieva, M.A. Baryshnikova, A.Yu. Baryshnikov

### MOLECULAR MECHANISMS OF MULTIDRUG RESISTANCE OVERCOMING BY LIPOSOMAL ANTITUMOR DRUGS

FSBSI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

#### Abstract

The liposomal antitumor drugs cell death induction mechanism has been analyzed in this work. Liposomal dosage forms of doxorubicin, cisplatin and aranosin overcome drug resistance. However, the mechanism of overcoming drug resistance by these drugs is different. Liposomal doxorubicin overcomes multidrug resistance by liposomes binding with the P-glycoprotein in 185 position of glycine. Liposomal cisplatin overcomes monoresistance by external apoptosis gene activation. The liposomal aranosin does not use CD95/Fas signaling pathway of apoptosis. Thus, liposomal drug action mechanism depends on the type of cells, and on the antitumor drug, that is enclosed in a liposome and can be individualized in each case.

**Key words:** multidrug resistance, antitumor drugs, liposomes.

#### Введение

В опухолевых клетках в ответ на действие даже одного цитостатического агента может развиваться МЛУ к большому количеству других препаратов, еще не воздействовавших на опухоль, различающихся по структуре и механизмам действия.

В основе лекарственной устойчивости лежит множество механизмов. Основные:

- 1) гиперэкспрессия генов множественной лекарственной устойчивости (ген множественной устойчивости MDR или Р-гликопротеин, MRP, BCRP и др.);
- 2) изменения в метаболизме липидов (церамидный путь);
- 3) элиминация препаратов детоксикационной системой;
- 4) секвестрация лекарства внутри лизосом и эндосом;

- 5) угнетение захвата препаратов через изменение поверхностных рецепторов и носителей;
- 6) инактивация лекарств через обусловленную глутатионом редукцию;
- 7) гиперэкспрессия таргетных ферментов, таких как тимидилат синтетазы;
- 8) изменение мишеней препаратов, таких как топоизомераза II;
- 9) повышение репаративной способности ДНК;
- 10) угнетение способности подвергаться апоптозу;
- 11) индукция гипоксией гиперэкспрессии генов семейства ABC-транспортеров, Bcl-2, глутатиона, металлотионина, через активацию транскрипционного фактора HIF1;
- 12) хромосомные нарушения в опухолевых клетках, приводящие к гиперэкспрессии антиапоптотических генов;

13) изменение сигнальных передающих путей в опухолевых клетках через интегриновые рецепторы, рецепторы факторов роста, приводящие к блокаде апоптоза и экспрессии MDR-подобных генов, которые вовлечены в восстановление ДНК и выкачивающий насос.

Развитие лекарственной резистентности – длительный биологический процесс, возникающий как защита клетки от индукции апоптоза после инкубации с повышающимися концентрациями препарата [56].

Наиболее интенсивно исследовалась МЛУ, опосредованная генами семейства ABC-транспортеров. На основании гомологичной последовательности белков и филогенетического анализа у млекопитающих идентифицировано 56 ABC-транспортеров.

HUGO классифицировала ABC-транспортеры в 7 семейств: ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, White. Семейства подразделяются на субсемейства (A, B, C), а те в свою очередь разделяются на изоформы (1; 2; 3 и т.д.). В клинических исследованиях показана связь между гиперэкспрессией ABC-транспортеров и резистентностью к химиотерапии [97; 102; 103].

В МЛУ участвуют также 7 генов монорезистентности и гены рецепторов внешнего апоптоза [4; 40].

Проводится поиск способов и препаратов, преодолевающих лекарственную резистентность. Так, показано, что МЛУ преодолевают липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов [3; 51; 72; 75]. На протяжении последних трех десятилетий липосомы изучаются в качестве многообещающей системы доставки противоопухолевых препаратов [2; 17; 25; 26; 34–39; 49]. В онкологической клинике эта концепция поддерживалась феноменом EPR, обеспечивающим пассивное накопление липосом определенного размера в солидных опухолях [5; 15–17; 53]. Этот эффект обусловлен патологическим ангиогенезом в опухоли [45; 104–107]. Клиническое применение липосом рассмотрено в ряде обзоров [34–38; 62]. В клинике липосомы применяются с целью снижения системной токсичности [21–23]. Так, Doxil (ПЭГилированные липосомы, содержащие доксорубин) имеет значительно меньшую кардиотоксичность по сравнению с таковой свободного препарата [91].

Вообще, критически важным параметром является высвобождение препарата из липосомы. В связи с этим фактом фармацевты разрабатывают липосомы с контролируемым высвобождением: термочувствительные и pH-зависимые [46–48; 79].

Липосомальная лекарственная форма изменяет биодоступность противоопухолевых веществ, их фармакокинетику, фармакоцинтикинетику, сигнальные пути индукции клеточной гибели [6; 24; 42; 43; 52].

Механизмы действия липосомальных препаратов следует рассматривать

- 1) на уровне макроорганизма (фармакокинетика, захват клетками РЭС,
- 2) на уровне опухоли (измененный ангиогенез),
- 3) на уровне клетки (пути проникновения, сигнальные пути, мишени).

Действие липосомальных препаратов на уровне организма и опухоли рассмотрено в обзорах [6; 9; 28].

Хотя стратегия использования липосом приводит к локальному и внутриклеточному накоплению противоопухолевых препаратов, неожиданно малое количество работ сфокусировано на использовании липосом для преодоления лекарственной устойчивости и изучения механизмов преодоления этого феномена [75].

**Целью настоящего** литературного обзора является анализ возможных механизмов действия липосомальных противоопухолевых препаратов.

#### **Гиперэкспрессия ABC-транспортеров**

Исследований, посвященных преодолению липосомами МЛУ, связанной с ABC-транспортерами, немного. Большинство исследований были проведены с липосомальным доксорубином [51; 101]. Свободный доксорубин попадает в клетки через несколько минут после начала инкубации, затем быстро выводится из них ABC-транспортерами [61]. Доксорубин входит в круг препаратов МЛУ и выбрасывается из клетки по принципу градиента посредством насоса, который является Р-гликопротеином, или других ABC-транспортеров. Работы проводили на клеточных линиях с гиперэкспрессией Р-гликопротеина [83; 91]. Липосомальный доксорубин попадает в клетку через 1–3 ч инкубации [90]. Затем он достигает ядер резистентных клеток [99]. Липосомальный доксорубин был цитотоксичным для резистентных клеток линии A2780/AD рака яичника и клеток линии CT26/DOX толстой кишки, растущих у иммунодефицитных мышей [84; 110], а также для карциномы Герена у крыс [101]. Липосомальный доксорубин имеет лучший терапевтический индекс у больных с метастатическим раком молочной железы с плохим ответом на химиотерапию [81]. Кроме того липосомальный доксорубин вызывает апоптоз в клетках эндотелия сосудов в лекарственно-резистентных опухолях [84].

Доксорубин выбрасывается из клеток линии K-562, и они устойчивы к цитотоксическому действию препарата [51]. С другой стороны, липосомальный доксорубин вызывал гибель как родительских клеток K-562, так и клеток с гиперэкспрессией *MDR1* дозо-зависимым образом. Похожие результаты были получены на клетках рака молочной железы MCF-7/Dox, гиперэкспрессирующих Р-гликопротеин [70]. R. Krishna et LD. Mayer [74] использовали липосомальный доксорубин и ингибитор Р-гликопротеина PSC 833 и продемонстрировали хороший результат этой комбинации.

Одна из проблем доставки препаратов с помощью липосом заключается в плохом проникновении последних в опухолевые клетки. Липосомы проникают в клетку посредством эндоцитоза [28]. Однако не все клетки способны эндоцитировать липосомы. Для улучшения проникновения липосом в клетки используются ТАТ-пептиды, антитела [6; 53] и различные лиганды, связывающиеся с рецептором [71]. Т. Kobayashi et al. [71] для улучшения эндоцитоза липосом присоединили к ним трансферрин, который связываясь с рецептором трансферрина (CD71) индуцирует попадание этих таргетных липосом в CD71<sup>+</sup> клетки. Липосомальный доксорубин накапливался в резистентных по *MDR* клетках SBC-3 в 3,5 раз больше, чем свободный доксорубин. Эффект липосомального доксорубина на *MDR* клетки не отличался от такового на *MDR*<sup>+</sup>. С помощью конфокальной микроскопии показали, что инкапсулированный в липосомы доксорубин локализовывался внутри клеток, особенно – в ядре [71].

A. Rohaman et al. [91] продемонстрировали, что инкапсулированный в липосомы доксорубин был более цитотоксичен для клеток LZ китайского хомячка, колоректального рака человека и миело-моноцитарного лейкоза HL-60, гиперэкспрессирующих MDR1, по сравнению с о свободным препаратом. Эти же липосомы убивали клетки HL-60, устойчивые к адриамицину и винкристину. Концентрация свободного доксорубина, вызывающая 50 %-ную ингибицию роста клеток (ИК<sub>50</sub>), была для линий HL-60, HL-60/ADR, HL60/VCR соответственно 30 нМ, 9 мкМ, 0,9 мкМ. ИК<sub>50</sub> липосомального доксорубина для клеток HL-60 и HL-60/ADR составила 20 нМ и 9 мкМ соответственно. Клетки HL-60/VCR были более чувствительны к липосомальному доксорубину по сравнению со свободным препаратом. Авторы изучали возможный механизм преодоления МЛУ. Липосомы, нагруженные доксорубином или пустые, ингибировали фотоаффинность меченного азидопином Р-гликопротеина [100].

Из этих экспериментов сделали заключение, что липосомальный доксорубин преодолевает резистентность MDR1, напрямую взаимодействуя с Р-гликопротеином. Мембрана резистентных клеток более текучая по сравнению с мембраной чувствительных клеток [58]. Сообщалось, что эффективность интернализации липосом в клетки является функцией липидной композиции [78]. Для мультирезистентных клеток характерными признаками являются текучесть клеточной мембраны, неспецифический адсорбционный эндоцитоз, повышенный трафик между цитоплазматической мембраной и мембранами внутриклеточных органелл [63].

Спустя 20 лет итальянские коллеги вернулись к изучению механизма преодоления МЛУ липосомальным доксорубином [90]. Они использовали анионные липосомы, содержащие доксорубин («Липодокс»). В качестве модели служили клетки HT29 рака толстой кишки человека с гиперэкспрессией Р-гликопротеина. Липосомальный доксорубин одинаково действовал на обычные клетки HT29 и резистентные клетки HT29-dx. Однако свободный доксорубин убивал только клетки без экспрессии Р-гликопротеина. Активность липосом не повышалась под действием верапамила или циклоспорина. Эксперименты по блокаде связывания показали, что липосомы конкурировали с веропамилом и циклоспорином за места связывания. Сайт-направленным мутагенезом доказали, что местом связывания липосом является глицин в 185-й позиции в Р-гликопротеине.

Таким образом, липосомальные препараты ингибируют МЛУ путем связывания Р-гликопротеина в 185-й позиции глицина.

#### Резистентность к цисплатину

Цисплатин<sup>1</sup> является главным компонентом стандартной химиотерапии рака яичника.

Препарат образует сшивки в ДНК, которые наиболее часто представляют собой перекрестные связи между цепями или внутри цепей ДНК. Сшивки платины с ДНК ингибируют ДНК- и РНК-полимеразы, нарушают деление клеток и индуцируют программированную клеточную смерть (апоптоз) [18; 66–68; 93]. Образование ДНК-аддуктов является главным механизмом действия

платиновых препаратов. Цисплатин индуцирует образование ROS, фосфорилицию p38 MAPK [108] и митохондриальный путь апоптоза [57].

Лекарственная устойчивость к препаратам платины зависит от генов монорезистентности *ERCC1* и *ERCC2*. Эти гены определяют индивидуальную переносимость препаратов платины (оксалиплатин) при проведении химиотерапии. Ферменты *ERCC1* и *ERCC2* относятся к группе ферментов, участвующих в эксцизионной репарации ДНК путем удаления нуклеотидов NER. Такие ферменты распознают и удаляют одиночные ошибочно спаренные нуклеотиды, а также петли длиной в 1–3 нуклеотида. NER человека способна восстанавливать цепи ДНК в случае повреждения нуклеотидов. Повышенная экспрессия *ERCC1* и *ERCC2* ассоциирована с пониженной чувствительностью опухолей к воздействию препаратов платины. Наличие полиморфизма в 118 кодоне *ERCC1* связано со снижением экспрессии гена и, соответственно, с увеличением эффективности применения оксалиплатина. Распространенность полиморфизма среди европейской популяции составляет около 35 % [85].

Резистентность к цисплатину не зависит от Р-гликопротеина [75]. Механизмы, приводящие к резистентности к препаратам платины, комплексные:

- 1) угнетение захвата [80; 94], повышение выброса [60] и повышение инактивации цисплатина [86];
- 2) дефект в распознавании повреждения ДНК в результате развития клеточной толерантности платинизации ДНК [65; 89; 109];
- 3) повышение экспрессии генов, стимулирующих пролиферацию клеток и ингибирующих апоптоз [59];
- 4) лекарственная устойчивость к препаратам платины зависит от генов монорезистентности *ERCC1* и *ERCC2*.

L. Galluzi и соавт. разделили механизмы резистентности к платине на претаргетную резистентность, таргетную, посттаргетную и внетаргетную [66; 67].

На модели клеток рака яичника A2780cis было показано, что цисплатин в липосомальной лекарственной форме преодолевает лекарственную резистентность, индуцированную свободным цисплатином [75]. Липосомальный цисплатин проникает в клетки A2780 рака яичника, используя клатрин-зависимый эндоцитоз, т.к. они утратили кавеоллин-1, опосредующий кавеолиновый захват. Липосомы аккумулируются преимущественно в поздних эндосомах/лизосомах. Цисплатин освобождается из лизосом и транспортируется в ядро [72].

В последующем эта группа авторов показала, что цитотоксическое действие липосомального цисплатина не ассоциировано с определяемой платинизацией ДНК в резистентных к цисплатину клетках рака яичника [72]. Это подтверждает, что механизм действия липосомального цисплатина отличается от свободного препарата. С целью досконального изучения механизма действия липосомального цисплатина, провели транскриптомный анализ устойчивых клеток после воздействия препаратами в ИК50. Анализ регуляции генов показал, что липосомальный цисплатин индуцирует экспрессию профиля различных генов, который отличается от профиля, индуцированного свободным препаратом. Главным регулятором экспрессии генов был ген-супрессор p53. Свободный цисплатин индуцировал гены митохондриального апоптоза (*BAX*, *VID*,

<sup>1</sup>Основным механизмом действия препаратов платины является прямое повреждение ДНК.

*CASP9*) возможно через активацию p38MAPK. В противоположность, липосомальный цисплатин индуцировал экспрессию генов путей повреждения ДНК и некоторых генов сигнальных путей внешнего апоптоза (*TNFRSF10B-DR5*, *CD70-TNFSF7*, *CD95/Fas*). Эти результаты указывают на то, что липосомальный цисплатин преодолевает цисплатин-индуцированную резистентность путем индукции повреждения ДНК и индукции сигнального пути внешнего апоптоза через рецепторы TNF. Этот вывод был подтвержден на уровне белков антителами к молекулам апоптоза [72]. Эта группа исследователей в последующем доказала это путем использования ингибиторов каспаз-8 и -9 [98]. Липосомальный цисплатин действительно индуцировал сигнальный путь внешнего апоптоза, активируя гены семейства TNF.

### Рецепторы апоптоза

Механизм лекарственной устойчивости также связан с рецептором внешнего сигнального пути апоптоза CD95/Fas [4; 50; 54; 55; 64; 76; 87; 88]. CD95 является членом суперсемейства рецепторов опухоли-некротического фактора (TNF) [4; 73]. Все члены этого семейства характеризуются наличием в цитоплазматической области домена смерти. В это суперсемейство входят рецепторы: CD95/Fas, TNF-R1, TRAILR-1, TRAILR-2, DR3, DR6 [77]. Перекрестное связывание CD95-рецептора с его лигандом или антителами против CD95 индуцирует апоптоз в чувствительных клетках. Наличие связанного с мембраной лиганда CD95L является обязательным условием для инициации сигнального пути. По экспрессии CD95/Fas лиганда клетки делятся на 2 типа. Первый тип клеток характеризуется высоким содержанием CD95/Fas и высоким уровнем каспазы-8, которая активирует каспазу-3 и индуцирует апоптоз. Второй тип клеток имеет низкий уровень CD95 DISC, и апоптотический сигнал опосредован через Bid с помощью прокаспазы-8 и транслокацией Bid в митохондрии и индукцией митохондриального пути апоптоза через каспазу-9 и активацию каспазы-3.

Химиопрепараты индуцируют выработку аутологичного лиганда, который соединяясь с рецептором инициирует каскад сериновых протеаз каспаз [4]. Утрата CD95/Fas рецептора приводит к устойчивости клетки к химиопрепаратам [7; 8; 14; 41; 44; 95; 96]. Опухолевые клетки утрачивают CD95 рецептор для ухода от иммунологического надзора [4]. Такие клетки устойчивы к внешнему апоптозу под влиянием химиопрепаратов.

Продукт гена множественной лекарственной устойчивости *MDR1* Р-гликопротеин ингибирует CD95/Fas-индуцированный апоптоз путем ингибции активности каспазы-8, но не препятствует образованию комплекса, индуцирующего сигнал смерти [92].

Липосомальные препараты преодолевают резистентность в клетках с отсутствием рецептора внешнего апоптоза CD95/Fas, и включенный в липосомы препарат оказывает цитотоксическое действие на клетки дозо-зависимым образом [7; 14].

В исследованиях использовали два препарата из группы нитрозомочевины<sup>2</sup> аранозу и ормустин [13; 19; 27]. Изучение механизма гибели клеток показало, что липосомальная араноза, использованная в этих опытах, вызывала апоптоз меланомных клеток.

Эффект проявлялся при инкубации клеток с липосомальным препаратом в течение 24; 48 и 72 ч.

Сотрудники РОНЦ им. Н.Н. Блохина обнаружили, что в отсутствие CD95/Fas рецептора клетки становятся устойчивыми к цитотоксическому действию противоопухолевых препаратов [10–12; 41; 44; 95; 96].

Потеря клетками острого лимфобластного лейкоза линии *Jurkat* рецептора CD95/Fas приводила к устойчивости к доксорубину и этопозиду [95; 96]. Потеря меланомными клетками линии *mel Mtp* рецептора CD95/Fas сделала их устойчивыми к препаратам из группы нитрозомочевины [7; 14].

Показано, что липосомальные препараты из группы производных нитрозомочевины преодолевают лекарственную устойчивость, вызванную отсутствием рецептора CD95/Fas [7; 8; 13; 14].

Для изучения механизма этого феномена были исследованы клеточные линии меланомы человека, полученные в РОНЦ им. Н.Н. Блохина по программе разработки противоопухолевых вакцин [1; 29–33; 82].

Была исследована экспрессия рецептора CD95/Fas и мРНК этого гена внешнего апоптоза. Обнаружено, что клетки *mel Mtp* и *mel MtpX* не экспрессируют рецептор CD95/Fas и не имеют мРНК этого гена. Клетки *mel Z* не экспрессируют рецептор CD95/Fas, но содержат мРНК CD95/Fas [7; 14].

Все эти клетки были резистентны к цитотоксическому действию аранозы и ормустина [13; 19; 20]. Однако они были чувствительны к цитотоксическому действию липосомальных лекарственных форм этих препаратов.

Затем была исследована индукция апоптоза в них под действием свободных и липосомальных форм препаратов.

Апоптоз определяли методом двойного окрашивания аннексином V, меченным FITC, и пропидием иодидом. В качестве контроля были выбраны клетки *mel Kor*, которые экспрессировали рецептор CD95/Fas и имели мРНК.

В клетках *mel Kor* свободная араноза, так же как и липосомальная араноза, индуцировала апоптоз. На клетках *mel Z*, *mel Mtp*, *mel MtpX*, на которых отсутствовал рецептор CD95/Fas, свободная араноза не индуцировала апоптоз в отличие от липосомальной аранозы [8].

Из этих исследований был сделан вывод, что липосомальная араноза не использует сигнальный путь CD95/Fas внешнего апоптоза.

### Заключение

Липосомальные лекарственные формы доксорубина, цисплатина и аранозы преодолевают лекарственную устойчивость.

Однако указанные механизмы у этих препаратов разные. Так, липосомальный доксорубин преодолевает МЛУ посредством связывания липосом с Р-гликопротеином в 185-й позиции глицина. Липосомальный цисплатин преодолевает монорезистентность активацией генов внешнего апоптоза. Липосомальная араноза не использует сигнальный путь апоптоза CD95/Fas.

Таким образом, механизм действия липосомального препарата зависит от типа опухолевых клеток, от самого противоопухолевого препарата, заключенного в липосому, и может быть индивидуален в каждом конкретном случае.

<sup>2</sup>Эти антимиетаболиты индуцируют алкилирование ДНК [69].

## Литература

1. Альбассит Б., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка липосомальной лекарственной формы нового соединения из класса нитрозоалкилмочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С.5.
2. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербаков А.И. и др. Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины // Иммунология. – 2014. – №6. – С. 317–21.
3. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–32.
4. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 58.
5. Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
6. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // Современная онкология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 4.
7. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бузова О.С. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
8. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Полозкова А.П. Влияние лекарственных форм аранозы на индукцию апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 64.
9. Барышникова М.А., Зангиева М., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
10. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
11. Блохин Д.Ю., Соколовская А.А., Власенкова Н.К. и др. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток, резистентных к апоптозу // Вестник РАМН. – 2007. – № 10. – С. 41–6.
12. Блохин Д.Ю., Власенкова Н.К., Герасимова Г.К. и др. Поиск молекулярных механизмов обеспечения множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 10.
13. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 49–53.
14. Грищенко Н.В., Барышникова М.А., Полозкова А.П. и др. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
15. Гуревич Д.Г., И.Г. Меерович И.Г., Г.А. 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.
16. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Бунатян Н.Д. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
17. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Орлова О.Л. и др. Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
18. Карапетян В.Л., Степанова Е.В., Барышников А.Ю. и др. Экспрессия маркеров апоптоза (p53, BCL-2, BAX) и их прогностическое значение при эпителиальных новообразованиях яичников ранних стадий // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 45–9.
19. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – № 2. – С. 24.
20. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
21. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П. и др. Доклиническое изучение общетоксического действия лиофилизированной липосомальной формы тиосенса (ЛЛЛФТ) // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 43.
22. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Изучение «хронической» токсичности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса на крысах // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 30.
23. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Дмитриева М.В., Оборотова Н.А. Изучение «острой» токсичности липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 51–6.
24. Левачева И.С., Барышникова М.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов липосомами // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С.32.
25. Ланцова А.В., Оборотова Н.А., Перетолчина Н.М. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности липосомальных лекарственных форм препаратов производных нитрозоалкилмочевины // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – №2. – С. 25–9.
26. Ланцова А.В., Барышникова М.А., Санарова Е.В. Изучение в системе in vitro наноструктурированной лекарственной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 31.



27. Лихванцева В.Г., Оборотова Н.А., Когония Л.М. и др. Первый опыт применения аранозы в лечении увеальных меланом // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 34–9.
28. Матюшин А.А., Барышников М.А., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Липосомы: организм, опухоль, клетка // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 6. – С. 3–10.
29. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
30. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестируемых антигенов в клетках меланомы человека // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – №1(37). – С. 29–39.
31. Михайлова Т.В., Барышников М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–66.
32. Михайлова Т.В., Барышников М.А., Багирова Н.С. и др. Стерилизация многослойных протеолипосом // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 9–12.
33. Михайлова Т.В., Барышников М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение уровня экспрессии HSP70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–8.
34. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
35. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 27–31.
36. Оборотова Н.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – Т. 36, № 10. – С. 47.
37. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 5. – С. 464.
38. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3–4. – С. 33–40.
39. Оборотова Н.А., Смирнова З.С., Полозкова А.П., Барышников А.Ю. Фармацевтические аспекты разработки липосомальных лекарственных форм для внутривенного введения гидрофобных цитостатиков // Вестник РАМН. – 2002. – № 1. – С. 42–45.
40. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 27–33.
41. Славина Е.Г., Бигвава Х.А., Заботина Т.Н. и др. Модификация фактором некроза опухоли (ФНО-альфа) цитотоксического и апоптотического действия противоопухолевых лекарств в клетках меланомы человека // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 37–44.
42. Смирнова З.С., Миерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
43. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфатфалоцианина // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
44. Соколовская А.А., Заботина Т.Н., Блохин Д.Ю., Барышников А.Ю. Идентификация лекарственно-индуцированного апоптоза в лейкозных клетках // Медицинская иммунология. – 1999. – Т. 1, № 3–4. – С. 109.
45. Степанова Е.В., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р. Оценка ангиогенеза опухолей человека // Успехи современной биологии. – Т. 120, № 6. – С. 599.
46. Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. Особенности инкапсулирования лекарственных препаратов в липосомы // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – № 8 (45). – С. 30–40.
47. Тазина Е.В., Мецержякова В.В., Игнатъева Е.В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 40–7.
48. Тазина Е.В., Оборотова Н.А. Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 4–12.
49. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
50. Уткин О.В., Сахарнов Н.А., Преснякова Н.Б. и др. Экспрессия CD95/Fas в клетках крови при раке толстой кишки // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 23–9.
51. Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клеточные линии, экспрессирующие активный pgp170 // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 20–3.
52. Хугаева О.В., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм метаксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 51–4.
53. Baryshnikov A.Yu., Baryshnikova M.A. Immunoliposomes and their targets // Russian J. General Chemistry. – 2013. – 83(12). – P. 2565–70.
54. Baryshnikov A.Y., Polosukhina E.R., Tupitsin N.N. et al. CD95 (Fas/APO-1) antigen is a new prognostic marker of blast cells of acute lymphoblastic leukaemia patients / Book Editor(s): Kaspers, GJL; Pieters, R; Veerman, AJP. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III Book Series: Advances in Experimental Medicine and Biology. 1999. – Vol.: 457. – P. 251–258
55. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Zabolina T.N. et al. FAS(APO-1/CD95) antigen: new activation marker for evaluation of the immune status // Russian Immunological J. – 1997. – 2(2). – P. 115.

56. Behrens B.C., Hamilton T.C., Masuda H. et al. Characterization of a c/s-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues // *Cancer Res.* – 1987. – 47. – P. 414–8.
57. Brogadj P., Armesilla A., Silva A., Porras A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation // *Apoptosis.* – 2007. – 12. – P. 1733–42.
58. Chauffert B., Martin F., Caignard et al. Cytofluorescence localization of Adriamycin in resistant colon cancer cells // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 1984. – 13. – P. 14–8.
59. Cheng J.Q., Jiang X., Fraser M. et al. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway // *Drug Resist Update.* – 2002. – 5. – P. 131–46.
60. Cole S.P.C., Deeley R.G., Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP // *Trends Pharmacol Sci.* – 2006. – 27. – P. 438–46.
61. Dalmarks M., Storms H., Fickian H. Transport process with features of transport catalysis. Doxorubicin transport in human red blood cells // *J. Gen. Physiol.* – 1981. – 78. – P. 349–64.
62. Davis M.E., Cheng Z.G., Shin D.M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer // *Nat Rev Drug Disco.* – 2008. – 7. – P. 771–82.
63. Endicott J.A., Lino V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance // *Ann Rev Biochem.* – 1989. – 58. – P. 137–71.
64. Flandalo M.V., Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis // *Exp. Oncol.* – 2012. – 34. – P. 165–75.
65. Francia G., Green S.K., Bocci G et al. Down-regulation of DNA mismatch repair proteins in human and murine tumor spheroids: implications for multicellular resistance to alkylating agents // *Mol Cancer.* – 2005. – 4. – P. 1484–94.
66. Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I. et al. Molecular mechanism of cisplatin resistance // *Oncogene.* – 2012. – 31. – P. 1869–83.
67. Galluzzi L., Vitale I., Michels J. et al. System biology of cisplatin resistance: past, present and future // *Cell Death and Disease.* – 2014. – 5. – e1257.
68. Jung Y., Lippard S. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage // *Chemical Rev.* – 2006. – 107.
69. Kapse-Mistry S., Govender T., Srivastava R., Yergen M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells // *Frontiers in Pharmacology.* – 2014. – 5. – P. 159–81.
70. Khariton N., Chekhun V.F., Yuchenco O.V., Rusetskaya N.V. Distribution and accumulation of liposomal form of doxorubicin in breast cancer cells of MCF-7 line // *Experimental Oncology.* – 2011. – 33. – P. 2.
71. Kobayashi T., Ishida T., Okada Y. et al. Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistance tumor cells // *Int J. Pharm.* – 2007. – 329. – P. 94–102.
72. Koch M., Krieger M.L., Stolting D. et al. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling // *Biochemical Pharmacology.* – 2013. – 85. – P. 1077–90.
73. Krammer P.H., Arnold R., Lavnik I.N. Life and death in peripheral T cells // *Nat Rev Immunol.* – 2007. – 7. – P. 532–42.
74. Krishna R., Mayer L.D. The use of liposomal anticancer agents to determine the roles of drug pharmacokinetics and P-glycoprotein (PGP) blockade in overcoming multidrug resistance // *Anticancer Res.* – 1999. – 19(4B). – P. 2885–91.
75. Kriger M.L., Eckstein N., Schneider V. et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro // *Int J Pharm.* – 2010. – 389. – P. 10–7.
76. Lavric I.N. Systems biology of death receptor networks: live and die // *Cell Death and Disease.* – 2014. – 5. – e1259.
77. Lavic I.N., Krammer P.H. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC // *Cell Death Differ.* – 2012. – 19. – P. 36–41.
78. Lee K.D., Hong K., Papahadiopoulos D. Recognition of liposomes by cells: In vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid head groups and surface charge density // *Biochim Biophys Acta.* – 1992. – 1103. – P. 185–97.
79. Levacheva I., Samsonova O., Tazina E. et al. Optimized thermosensitive liposomes for selective doxorubicin delivery: Formulation development, quality analysis and bioactivity // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2014. – 121. – P. 248–56.
80. Liang X.-J., Mukherjee S., Shen D.-M. et al. Endocytic recycling compartments altered in cisplatin-resistant cancer cells // *Cancer Res.* – 2006. – 66. – P. 2346–53.
81. Leonard R.C.F., Williams S., Tulpule A. et al. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: Focus on liposomal doxorubicin (Myocet<sup>TM</sup>) // *Breast.* – 2009. – 18. – P. 218–24.
82. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // *Melanoma Research.* – 2008. – № 5. – P. 303–13.
83. Mickisch G.H., Ranman A., Pastan I. et al. Increased effectiveness of liposome-encapsulated doxorubicin in multidrug-resistance-transgenic mice compared with free doxorubicin // *J Natl Cancer Inst.* – 1992. – 84.
84. Ogawara K., Un K., Tanaka K. et al. In vivo anti-tumour effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOX-resistant tumour-bearing mice: Involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells // *J. Controlled Release.* – 2009. – 133. – P. 4–10.
85. Park D.J., Zhang W., Sloehmacher J. et al. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy // *Clin Adv Hematol. Oncol.* – 2003. – 1(3). – P. 162–6.
86. Pasello M., Michelaco F., Scionti I. et al. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma // *Cancer Res.* – 2008. – 68. – P. 6661–4.

87. Polosukhina E.R., Zobotina T.N., Shishkin Yu.V. et al. Studing of Fas(APO-1/CD95) antigen expression by flow cytometry with monoclonal antibodies IPO-4 // *Experimental Oncology*. – 1997. – 19(3). – P. 206–11.
88. Polosukhina E.R., Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. et al. Expression of antigen CD95(Fas/APO-1) medisting apoptosis in hemoblastosis using monoclonal antibodies ICO-160 // *Hematology and transfusiology*. – 2000. – 45(4). – P. 3–6.
89. Powell S.N., Bindra R.S. Targetting the DNA damage response for cancer therapy // *DNA Repair*. – 2009. – 8. – P. 1153–65.
90. Riganti C., Voena C., Kapecka J. et al. Liposome-encapsulated doxorubicin rwversed drug resitemce by inhibiting P-glycoprotein in human cancer cells // *Molecular Pharmaceutics*. – 2011. – 8. – P. 683–700.
91. Rohaman A.M., Yusuf S.W., Ewer M.S. Antracyclin-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation // *Int J Nanjmed*. – 2007. – 2. – P. 567–83.
92. Ruefli A.A., Tainton K.M., Darcy P.K. et al. P-glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation // *Cell Death Differ*. – 2002. – 9. – P. 1266–72.
93. Sancho-Martinez S.M., Prieto-Garcia L., Prieto M. et al. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integran view // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2012. – 136. – P. 35–55.
94. Shen D.W., Pouliot F., Hall M.D. et al., Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes // *Pharmacol Rev*. – 2012. – 64. – P. 705–21.
95. Sokolovskaya A.A., Zobotina T.N., Blokhin D.Yu. et al. Comparative analysis of apoptosis induced by various anticancer drugs in Jurkat cells // *Experimental Oncology*. – 2001. – 23(1). – P. 46–50.
96. Sokolovskaya A.A., Zobotina T.N., Blokhin D.Yu. et al. CD95-dificient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis // *Experimental Oncology*. – 2001. – 23(3). – P. 175–80.
97. Stavrovskaya A.A., Sedyakhina N.P., Stromskaya T. et al. Prognostic value of P-glycoprotein and correlation with CD34 antigen // *British J. Heamatology*. – 1998. – 28(5–6). – C. 469–82.
98. Stolting D., Koch M., Wiese M. et al. Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of A2780 ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway // *Int J Clinic Pharmacol and Therap*. – 2014. – 52. – P. 78–81.
99. Thiery A.R., Dritschalo A., Rahmon A. Effect of liposome on P-glycoprotein function in multidrug-resistance cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 1992. – 187. – P. 1098–108.
100. Thiery A.R., Vige D., Coughlin S. et al., Modulation of doxorubicin resistance in multidrug resistant cells by liposomes // *FASEB J*. – 1993. – 7. – P. 572–9.
101. Todor I.N., Lukianova N.Y., Tymovska Y.A. et al. The effect of liposomal doxorubicine form on drug resistant tumor phenotype // *Oncology*. – 2013. – 15(4). – P. 279–85.
102. Turkina A.G., Baryshnikov A.Yu., Sedyakhina N.P. et al. Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous-leukaemia patients: Expression, activity and correlations with CD34 antigen // *British Journal of Heamatology*. – 1996. – 92. – P. 88–96.
103. Turkina A.G., Zobotina T.N., Kusnetzov S.V. et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 1999. – 457. – P. 477–88.
104. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // *Melanoma Research*. – 2007. – 17(1). – P. 1–8.
105. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level // *Melanoma Research*. – 2007. – 17(6). – P. 370–9.
106. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Gutorov S.V. et al. Prognostic significance of periodic acid-schiff-positive patterns in clear cell renal carcinoma // *The Canadian Journal of Urology*. – 2009. – 16(4). – P. 4726–32.
107. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Grigorjeva I. et al. VEGFR1 and PKCa signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VGFR2 kinasa-idependent manner // *Melanoma Research*. – 2011. – 21(2). – P. 91–8.
108. Winograd-Katz S.E., Levitzki A. Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorelation of the EGF receptor // *Oncogene*. – 2006. – 25. – P. 7381–90.
109. Yin M., Yin J., Martinez-Balibrea E. et al. ERCC1 and ERCC2 pokimorphisms predict clinical outcomes of oxiplatin-based chemoyherapies in gastric and colorectal cancer: systemic revies and meta-analysis // *Ckinic Cancer Res*. – 2011. – 17. – P. 1632–40.
110. Zalipsky S., Saad M., Kiwan R. et al. Antitumour activity of new lipospmal prodrug of mitomycin C in multidrug resistant solid tumour: Insights of the mechanism of action // *J. Drug Targeting*. – 2007. – 15. – P. 518–30.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006.81:576.3.017.22:616-097.3

М.В. Оборотова, О.С. Булова, М.А. Барышникова, Т.Н. Заботина, К.А. Барышников,  
И.Н. Михайлова, Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Барышников

### ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

#### Контактная информация

Оборотова Марина Вячеславовна, аспирант лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-10-65

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

Статья поступила 02.02.2015, принята к печати 09.02.2015.

#### Резюме

**Целью данной работы** стало изучение экспрессии антигенов, ассоциированных со стволовыми опухолевыми клетками, на перевиваемых клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека, полученных в ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина». В реакции прямой иммунофлуоресценции с помощью МКА была изучена экспрессия антигенов CD133, CD117, CD90, CD34, CD44 и CD24, ассоциированных с СОК. В качестве отрицательного контроля использовали изоспецифические антитела, с которыми показатели флуоресценции не превышали 0,5 % антиген-положительных клеток. Экспрессия антигенов, ассоциированных с СОК, была гетерогенна. Если принять за дискриминационный уровень 10 % антиген-положительных клеток, то экспрессия CD133 и CD117 наблюдалась на 6 (28,5 %), CD90 – на 12 (57 %), CD 34 – на 4 (19 %), CD 44 – на 17 (81 %) и CD 24 – на 5 (23,8 %) из 21 линии. На других линиях клеток экспрессия этих антигенов составила менее 10 % (1–8,5 %). При клонировании в полужидком агаре клеток линии *mel 1br*, экспрессирующих на своей поверхности 8,5 % антигена CD133, был получен клон клеток, экспрессирующих 100 % CD133<sup>+</sup>. Таким образом, опухолевые клетки, экспрессирующие небольшой процент СОК-ассоциированных антигенов, также являются СОК, а остальные антиген-отрицательные клетки – их потомками.

**Ключевые слова:** стволовые опухолевые клетки, меланома, моноклональные антитела, проточная цитометрия.

M.V. Oborotova, O.S. Burova, M.A. Baryshnikova, T.N. Zabolina, K.A. Baryshnikov,  
I.N. Mikhailova, L.F. Morozova, N.M. Suraeva, Z.G. Kadagidze, A.Yu. Baryshnikov

### CANCER STEM CELLS ANTIGENS EXPRESSION AT MELANOMA CELL LINES

FSBSI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

#### Abstract

The aim of this work was to study antigen expression associated with cancer stem cells at human metastatic melanoma transplantable cell lines received in FSBSI «N.N. Blokhin RCRC». Expression of CD133, CD117, CD34, CD90, CD24, CD44 associated with cancer stem cells has been explored in immunofluorescence reaction with monoclonal antibodies. Isospecific antibodies which values of immunofluorescence didn't increase 0,5 %-level of positive cells were used for negative control. The cancer stem cells antigen expression was heterogeneous. If we take 10% antigen-positive cells for discrimination level, we can see CD133-expression at 6 (28,5 %) cell lines of 21, CD117 – at 6 (28,5 %) cell lines of 21, CD90 – at 12 (57 %) of 21 lines, CD34 – at 4(19%) of 21 cell lines, CD44 – at 17(81 %) of 21 cell lines and CD24 – at 5 (23,8 %) of 21 lines. This antigens expression was less than 10 % (from 1 to 8.5 %) at other cell lines. After cloning *mel 1br* cell line that expressed on surface about 8.5 % of CD133 in semi-solid agar, the clone of cells expressed 100 % CD133<sup>+</sup> cells was obtained. Thus, tumor cells expressing a small percentage of CSC-associated antigens are also CSC, and other antigen-negative cells are their descendants.

**Key-words:** cancer stem cells, melanoma, monoclonal antibodies, flow cytometry.

#### Введение

В любой опухоли всегда имеется небольшая популяция, дающая потомство клеток во-первых, более дифференцированных, а во-вторых, способных к собственному воспроизведению [11; 35]. Эта популяция клеток со свойствами стволовости получила название стволовых. Первоначально СОК были обнаружены при остром миелоидном и хроническом миелоидном лейкозах [4; 12–14; 21; 22; 25; 32–34]. В последующем они были идентифицированы при многих злокачественных заболеваниях [23; 24; 26; 27; 29; 30; 31]. Эти клетки не только ответственны за рост и поддержание опухоли,

но и могут также запускать процессы рецидивирования неоплазмы, метастазирования и устойчивость к лучевому и химиотерапевтическому методам лечения. По данным литературы СОК экспрессируют следующие антигены: CD 133, CD 117, ALDH, CD44, CD34, CD271, CD90 и CD24 [3; 10; 35; 36].

В РОИЦ в рамках программы создания противоопухолевых вакцин получена большая коллекция клеточных линий метастатической меланомы кожи человека [1; 2; 5–8; 16; 18; 19]. Эти клеточные линии охарактеризованы по иммунологическому фенотипу и по наличию раково-тестикулярных антигенов, но у них не изучали экспрессию маркеров СОК [15; 17; 20; 28].

Таблица 1

Экспрессия антигенов на меланомных клеточных линиях

№ п/п	Название линии	Процент антиген-положительных клеток								
		Отрицательный Контроль	HLA-ABC	HLA-DR	CD133	CD117	CD90	CD34	CD24	CD44
1.	<i>Mel Z</i>	0,1	90,5	6,0	5,2	1,1	5,2	3,9	3,2	100
2.	<i>Mel Kor</i>	0,1	1,5	3,6	0,8	76,2	1,1	1,7	0,2	99,7
3.	<i>Malme-3M</i>	0,4	75,1	11,1	5,1	5,5	0,7	2,7	5,3	77,5
4.	<i>Mel Ibr</i>	0,4	92,0	8,8	8,5	3,0	55,2	1,7	1,7	100,0
5.	<i>Mel P</i>	0,6	71,3	9,4	3,0	6,2	4,6	4,2	4,5	44,6
6.	<i>Mel Mtp</i>	0,5	89,1	19,7	26,7	0,7	1,7	3,9	7,8	99,9
7.	<i>Mel MtpX</i>	0,1	1,4	5,2	2,1	2,1	1,2	1,4	0,2	1,2
8.	<i>Mel Cher</i>	0,2	33,2	7,6	7,7	18,1	5,2	7,5	1,0	92,5
9.	<i>Mel Is</i>	0,5	92,6	32,3	18,3	10,1	13,3	5,5	6,6	93,3
10.	<i>Mel Me</i>	0,3	35,8	5,5	5,3	6,5	14,8	0,8	3,0	74,8
11.	<i>Mel H</i>	0,0	77,2	28,9	11,3	1,2	10,0	10,2	3,2	100,0
12.	<i>Mel Hn</i>	0,3	32,5	1,5	36,0	16,0	2,6	8,2	6,9	65,6
13.	<i>Mel BGF</i>	0,4	73,5	6,0	3,8	8,0	13,7	6,5	7,7	3,7
14.	<i>Mel Si</i>	0,2	94	18,6	7,4	6,8	11,2	3,6	73,5	99,9
15.	<i>Mel Rac</i>	0,2	89,5	0,8	2,3	0,1	16,0	2,0	23,2	99,9
16.	<i>Mel Gus</i>	0,1	94,2	90,6	6,7	5,8	27,0	14,8	17,0	97,0
17.	<i>Mel Gi</i>	0,2	87,8	30,6	10,1	8,8	13,0	18,0	2,8	83,0
18.	<i>Mel Ksen</i>	0,1	79,2	85,6	3,3	11,3	11,8	7,4	3,1	97,9
19.	<i>Mel Ch</i>	0,0	80,9	7,5	11,4	6,0	15,7	10,0	14,2	5,7
20.	<i>Mel R</i>	0,0	79,8	4,0	8,2	28,9	2,4	4,5	13,0	2,4
21.	<i>Mel Il</i>	0,0	89,9	0,1	1,6	57,4	10,7	0,3	0,7	97,7

**Целью данной работы** стало изучение экспрессии на клетках меланомы человека антигенов CD133, CD117, CD90, CD34, CD44 и CD24.

#### Материалы и методы

##### Клеточные линии

Исследование проводили на 21 клеточной линии меланомы человека: *mel Mtp*, *mel Mtp X*, *mel Z*, *mel Kor*, *Malme-3M*, *mel Ibr*, *mel P*, *mel Cher*, *mel Is*, *mel Me*, *mel H*, *mel Hn*, *mel BGF*, *mel Si*, *mel Rac*, *mel Gus*, *mel Gi*, *mel Ksen*, *mel Ch*, *mel Il*, *mel R*, полученных из банка клеточных культур ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина».

Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицин (ICN, США), пируват натрия (ПанЭко, Россия), 0,1 %-ный р-р аминокислот и 0,1 %-ный раствор витаминов (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 %-ного CO<sub>2</sub>. Культуры клеток пересеивали через 3–4 дня.

##### Определение экспрессии антигенов

Экспрессию антигенов определяли в прямой РИФ. В работе использовали МКА анти-CD133/2 (MACS Miltenyi Biotec, Германия), анти-CD117 (MACS Miltenyi Biotec, Германия), анти-CD34 (MACS Miltenyi Biotec, Германия), анти-CD90 (BD Pharmingen, США), анти-CD24 (BD Pharmingen, США), анти-CD44 (BD Pharmingen, США), анти-CD90 (MACS Miltenyi Biotec, Германия).

В пробирки для проточной цитофлуориметрии помещали  $5 \times 10^5$  клеток в 50 мкл раствора PBS и добавляли 10 мкл МКА. После 30 мин инкубации клеток в холодильнике при +4 °С их двукратно отмывали PBS, далее отделяли центрифугированием в течение 6 мин при скорости 1000 об/с. Затем надосадочную жидкость удаляли и добавляли 300 мкл 1 %-ного р-ра формалина в PBS.

Экспрессию антигенов оценивали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (Beckton Dickinson, США).

#### Результаты и обсуждение

Клеточные линии различались по экспрессии антигенов, ассоциированных с СОК (табл. 1). В качестве отрицательного контроля использовали изо-специфические антитела.

В отрицательном контроле показатели не превышали 0,5 % клеток. В качестве положительного контроля использовали антигены HLA 1 и 2 классов.

Антигены HLA 1 класса были представлены на клетках 19 линий.

Они не репрезентировались на клетках линии *mel Kor*, в которой отсутствует β2-микроглобулин [9] и клетках *mel MtpX*.

С последними не реагировали никакие из использованных в эксперименте МКА (табл. 1). Антигены HLA 2 класса были экспрессированы на клетках 5 линий, что подтверждает ранее полученные результаты [15; 19].

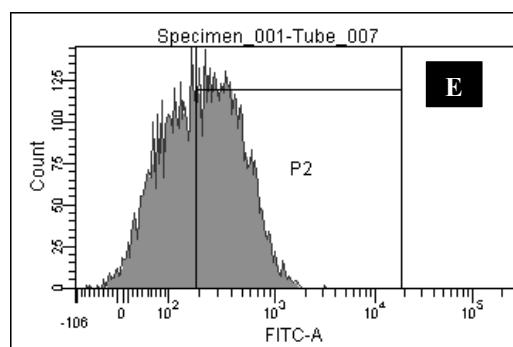
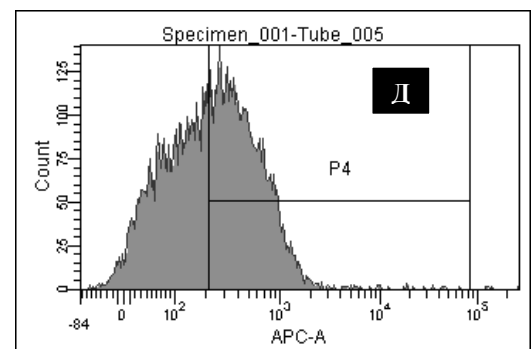
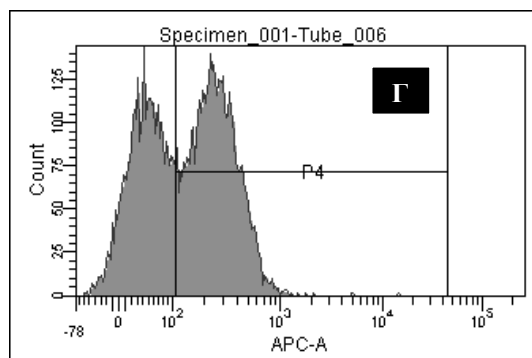
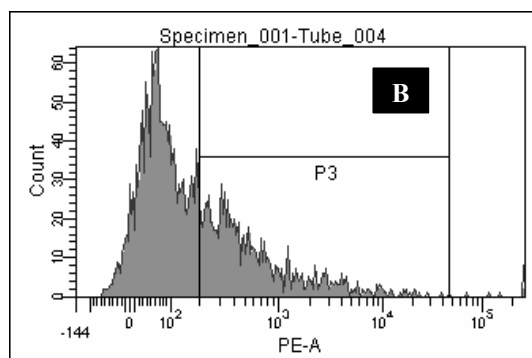
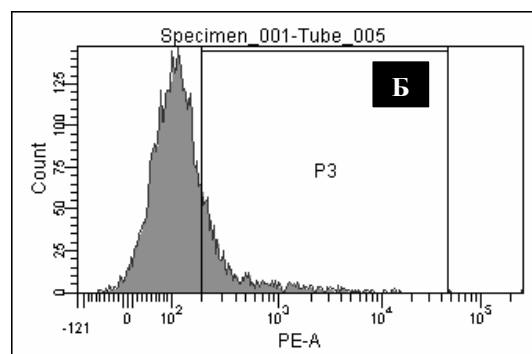
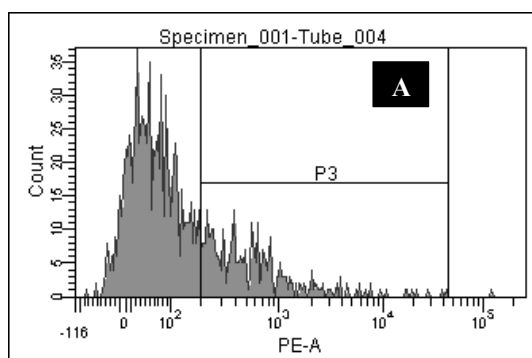
Экспрессия антигенов, ассоциированных с СОК, была гетерогенна (см. табл. 1). Если принять за дискриминационный уровень 10 % клеток, экспрессия CD133 и CD117 наблюдалась на 6 (28,5 %) из 21 линии, CD90 – на 12 (57 %), CD 34 – на 4 (19 %), CD44 – на 17 (81 %) и CD 24 – на 5 (23,8 %) из 21 линии.

На других линиях клеток экспрессия этих антигенов была менее 10 % (от 1 до 8,5 %). Образцы гистограмм распределения антиген-положительных клеток представлены на рис. 1.

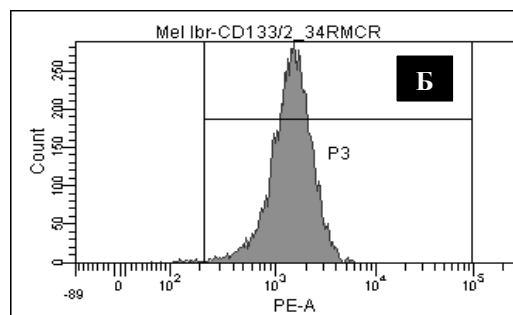
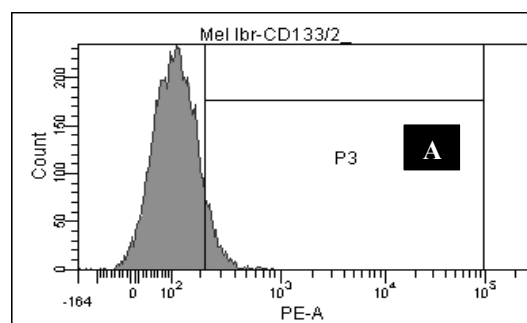
Клетки с невысоким уровнем экспрессии СОК-ассоциированных антигенов могут иметь небольшую популяцию СОК, так называемую «side population».

Для подтверждения этой гипотезы мы клонировали в полужидком агаре клетки линии *mel Ibr*, экспрессирующей на своей поверхности 8,5 % антигена CD133.

Был получен клон этих клеток, названный *mel Ibr RMCR*, экспрессирующий 100 % CD133<sup>+</sup> клеток (рис. 2).



**Рис. 1.** Гистограммы распределения клеток:  
 А – *mel Mtp*, окрашенные антиCD133-PE;  
 Б – *mel Is*, окрашенные антиCD133-PE;  
 В – *Mel Hn*, окрашенные антиCD133-PE;  
 Г – *Mel Kor*, окрашенные антиCD117-APC;  
 Д – *mel Il*, окрашенные антиCD117-APC;  
 Е – *mel Ibr*, окрашенные антиCD90- FITC.



**Рис. 2.** Гистограммы распределения клеток линии *mel Ibr* и ее клона *mel Ibr RMCR*, окрашенных моноклональными антителами к CD133/2.

Таким образом, в одной клеточной линии опухолевые клетки, экспрессирующие небольшой процент СОК-ассоциированных антигенов, являются СОК, а остальные клетки – их потомками. Ранее было показано, что длительная инкубация CD133<sup>+</sup> клеток с химиопрепаратами также приводит к увеличению доли CD133<sup>+</sup> клеток [36].

Наиболее часто на клеточных линиях встречался антиген CD44 – на 18 (85,7 %) из 21 клеточной линии (табл. 1).

Он был выявлен на поверхности от 46 до 100 % клеток. Антиген CD44 в сочетании с другими СОК-ассоциированными антигенами помогает в выделении СОК.

Так, например, Chen et al. показали, что сочетание двух маркеров, CD117 и CD44, позволяет выделить СОК в популяции клеток рака яичника [26].

Не было выявлено особых различий в характеристике роста в культуре между линиями клеток, экспрессирующих разные проценты антиген-положительных клеток и степенью их морфологической характеристики.

#### Выводы

1. Клеточные линии, полученные из метастатической меланомы кожи человека, экспрессируют маркеры стволовых опухолевых клеток.

2. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток гетерогенна и колеблется от единичных процентов до 100 %.
3. Из клеточной линии, экспрессирующей низкий процент антиген-положительных клеток, можно выделить клон со 100 %-ной экспрессией СОК-ассоциированного антигена.
4. Исследованные клеточные линии могут быть использованы при изучении СОК, а также при поиске способов влияния на них при терапии меланомы.

#### Литература

1. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербаков А.И. и др. Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины // Иммунология. – 2014. – № 6. – С. 17–21.
2. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
3. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – № 8. – С. 4.
4. Барышников А.Ю. Иммунологический фенотип ранних гемопоэтических клеток-предшественников человека // Эксперим. онкология. – 1993. – Т. 15, № 6. – С. 3–7.
5. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
6. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2004. – № 2. – С. 59–63.
7. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
8. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Петенко Н.Н. Современные проблемы биотерапии опухолей // Вестник Московского Онкологического Общества. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
9. Бережной А.Е., Сапрыкина Н.С., Козлов А.М. и др. Изучение противоопухолевой активности вакцин на основе генетически модифицированных опухолевых клеток, секретирующих ГМ-КСФ // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 47–53.
10. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
11. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Мищенко П.В., Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработке новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 14. – С. 3–12.
12. Зоботина Т.Н., Седыхина Н.П., Хорошко Н.Д. и др. Коэкспрессия антигена CD34 ранних гемопоэтических предшественников и антигена Fas/АРО-1, опосредующего апоптоз // Экспериментальная онкология. – 1994. – Т. 16, № 4–6. – С. 343–7.
13. Кадагидзе З.Г., Туцицын Н.Н., Зоботина Т.Н. и др. Иммунофенотипические и функциональные особенности стволовых клеточных лейкозов // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 43–8.
14. Кадагидзе З.Г., Туцицын Н.Н., Зоботина Т.Н. и др. Дифференцировочные антигены ранних предшественников гемопоэтических клеток человека // Вестник ОНЦ. – 1996. – № 2. – С. 27–34.
15. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Т. 37, № 1. – С. 29–39.
16. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
17. Михайлова И.Н., Библиацвили Р.Ш., Ковалевский Д.А. Раково-тестикулярные антигены как потенциальные мишени для вакцинотерапии опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 17–26.
18. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
19. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Багирова Н.С. и др. Стерилизация многослойных протеолипосом // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 13–8.
20. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение уровня экспрессии HSP70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–8.
21. Туркина А.Г., Моисеева И.Н., Фролова Е.А. и др. «Примитивный» вариант бластного криза хронического миелолейкоза // Тер. архив. – 1995. – Т. 67, № 7. – С. 22–5.
22. Фролова Е.А., Френкель М.А., Лебедева Н.Б. и др. Моноклональные антитела ICO-115 к антигену CD34 человека // Вестник ОНЦ РАМН. – 1994. – Приложение. – С. 10–2.
23. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – P. 3983–8.
24. Barker N., van Es J.H., Kuipers J. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 // Nature. – 2007. – 449(7165). – P. 1003–7.
25. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // Nature. – 1997. – 37(7). – P. 730–7.
26. Chen X., Zhang J., Zhang J. et al. Cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, and drug resistance in high-grade ovarian serous // Human Pathology. – 2013. – 44(11). – P. 2373–84.
27. Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E. et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer // Cell. – 2005. – 121(6). – P. 823–35.
28. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – № 5. – P. 303–13.
29. Ricci-Vitani L., Lombardi D.G., Pillozzi E. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells // Nature. – 2007. – 445(7123). – P. 111–5.
30. Shackleton M., Vaillant F., Simpson K.J. et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell // Nature. – 2006. – 439(7072). – P. 84–8.
31. Stingl J., Eirew P., Ricketson I. et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells // Nature. – 2006. – 439(7079). – P. 993–7.
32. Turkina A.G., Baryshnikov A.Y., Sedyakhina N.P. et al. Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenousleukaemia patients: Expression, activity and correlations with CD34 antigen // British Journal of Haematology. – 1996. – 92. – P. 88–96.
33. Turkina A.G., Zobotina T.N., Kusnetsov S.V. et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 1999. – 457. – P. 477–88.
34. Stavrovskaya A.A., Sedyakhina N.P., Stromskaya T. et al. Prognostic value of P-glycoprotein and correlation with CD34 antigen // British J. Haematology. – 1998. – 28(5–6). – P. 469–82.
35. Valentin S., Brutel J. Cancer Stem Cell Immunology: Key to Understanding Tumorigenesis and Tumor Immune Escape? // Frontiers Immunology. – 2014. – 5. – P. 360.
36. Woo T., Okudela K., Mitsui H. et al. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas // Int J Clin Exp Pathol. – 2010. – 4. – P. 32–42.

УДК 615.2/3:577.352.2:576.36

Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Ю.А. Хоченкова, П.В. Голышко,  
Д.А. Хоченков, Е.В. Степанова, О.О. Рябая

**ЛИПОСОМАЛЬНАЯ АРАНОЗА НЕ ИНДУЦИРУЕТ АУТОФАГИЮ**  
ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва

**Контактная информация**

Барышникова Мария Анатольевна, к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: [ma\\_ba@mail.ru](mailto:ma_ba@mail.ru)

Статья поступила 08.11.2014, принята к печати 24.11.2014.

**Резюме**

Ранее было показано, что араноза в лекарственной форме "Липофилизат для приготовления раствора для инъекций" (араноза-лио) вызывает клеточную смерть за счет активации апоптоза через CD95-рецептор в отличие от ее липосомальной лекарственной формы, механизм действия которой пока не изучен. Известно, что гибель опухолевых клеток под воздействием противоопухолевых препаратов может также проходить через активацию аутофагии.

**Цель данной работы** – определить влияние липосомальной лекарственной формы аранозы на аутофагию.

Исследование проводили на клеточных линиях меланомы человека *mel Mtp*, *mel Ibr*, *mel Kor*, *mel Z* и *mel Mtp clone X*. Клетки инкубировали в течение 24 ч с аранозой-лио, либо с липосомальной аранозой в концентрации 450 мкг/мл, после чего проводили анализ экспрессии мРНК гена *Beclin 1*.

В результате на большинстве клеточных линий показано снижение экспрессии мРНК *Beclin 1*. Это может быть связано с тем, что липосомальная форма препарата вызывает гибель клеток по механизму внутреннего апоптоза, который подавляет аутофагию.

**Ключевые слова:** араноза, липосомы, аутофагия, клеточная гибель.

Д.А. Afanasieva, M.A. Baryshnikova, Yu.A. Khochenkova, P.V. Golyshko,  
D.A. Khochenkov, E.V. Stepanova, O.O. Ryabaya

**THE LIPOSOMAL ARANOSA DOES NOT INDUCE AUTOPHAGY**  
FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow

**Abstract**

Previous studies have shown that aranosolio initiate cell death by activation of CD95-receptor of apoptosis. The mechanism of liposomal aranosolio action is still unknown.

Anticancer drugs may cause tumor cell death by the activation of autophagy.

The purpose of this study was to determine the influence of liposomal aranosolio on autophagy.

The study was assessed on human melanoma cell lines *mel Mtp*, *mel Ibr*, *mel Kor*, *mel Z* and *mel Mtp clone X*. The cells were treated with aranosolio or liposomal aranosolio at concentration 450 µg/ml for 24 hours. The expression of autophagy were analyzed the expression of mRNA *Beclin 1*.

Expression of mRNA *Beclin 1* was reduced on the majority of cell lines, which might be due to the fact that the liposomal form of the drug caused cell death by intrinsic apoptosis which is suppose to suppress autophagy.

**Key words:** aranosolio, liposomes, autophagy, cell death.

**Введение**

Идентифицировано несколько вариантов программированной клеточной смерти, таких как внешний и внутренний апоптоз, регулируемый некроз, аутофагия, пироптоз и другие [8; 22; 28]. Среди них наиболее хорошо изучен апоптоз [1; 2; 25; 26; 30–35]. Лекарственные противоопухолевые препараты индуцируют апоптоз по внешнему механизму посредством взаимодействия с «рецепторами смерти» (CD95/Fas, TNF и др) или внутреннему с вовлечением митохондрий. Различные лекарственные формы одного и того же препарата могут индуцировать апоптоз путем активации различных сигнальных механизмов. Наиболее яркий пример – препараты в лекарственной форме липофилизата для приготовления раствора для инъекций и в липосомальной лекарственной форме [6; 7]. При введении липосомальной лекарственной формы меняются фармакокинетика препарата, время

циркуляции в крови, механизмы взаимодействия и проникновения в клетку [5; 12; 14–17; 24].

Исследования последних лет показывают, что гибель опухолевых клеток, устойчивых к апоптозу, может пойти по пути активации неконтролируемой аутофагии [23]. Аутофагия представляет собой процесс, посредством которого самоликвидируются поврежденные органеллы клетки, внутриклеточные патогены, а также долгоживущие, аномальные или агрегированные белки. Основным механизмом процесса является формирование специализированных структур – аутофагосом.

Это двухмембранные липидные образования (пузырьки), которые захватывают органеллы или часть цитозоля, подлежащие разрушению, и расщепляют их с помощью гидролитических ферментов в аутолизосомах, которые образуются за счет слияния аутофагосом с лизосомами.

Влияние липосомальной лекарственной формы препарата на аутофагию еще не изучалось.



В связи с этим мы поставили задачу сравнить индукцию аутофагии двумя лекарственными формами противоопухолевого препарата аранозы – производного нитрозомочевинны. Этот препарат используется для лечения меланомы и опухолей нейроэндокринной природы [11; 19–21]. В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» получены две лекарственные формы аранозы – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций (араноза-лио) и липосомальная [9; 18]. Ранее было показано, что липосомальная араноза не использует CD95/Fas-зависимый внешний путь апоптоза [3; 4; 6; 7; 10].

**Целью настоящей работы** стало определение влияния липосомальной аранозы на модуляцию аутофагию.

## Материалы и методы

### Клеточные линии

Использованы клеточные линии диссеминированной меланомы человека *mel Z*, *mel Kor*, *mel Mtp*, *mel Ibr* и *Mel Mtp clone X*, полученные в НИИ ЭДиТО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [13; 29]. Клеточные линии культивировали на полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка (ТЭС, NuClone, США); 2мМ/мл глутамин, 50мг/мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 %-ного CO<sub>2</sub>.

### Определение уровня экспрессии мРНК Beclin1

Детекцию экспрессии мРНК *Beclin 1* определяли с помощью ОТ-ПЦР. Для этого клеточные линии *mel Z*, *mel Kor*, *mel Mtp*, *mel Ibr* и *Mel Mtp clone X* сажали по 2×10<sup>5</sup> клеток на лунку в дуплетах на 6-луночные планшеты в полной среде. Через сутки в лунки с клетками добавляли аранозу-лио в концентрации 450 мкг/мл и липосомальную аранозу в той же концентрации, инкубировали в течение 24 часов, после чего снимали с планшетов и лизировали, используя реагент *TRIzol*. Из лизата клеток выделяли тотальную РНК в системе хлороформ-изопропиловый спирт.

Обратную транскрипцию проводили в соответствии со стандартным протоколом [27]. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик» (Россия) по программам: 24 °С – 10 мин, 42 °С – 50 мин и 70 °С – 15 мин. Использовали праймеры для гена *Beclin1* F: 5'-AAGACAGAGCGATGGTAG-3' и R: 5'-CTGGGCTGTGGTAAGTAA-3' (продукт 282 н.п.); для β-Actin 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' и 5'-CTCCTTAATGTCACGACGATTTTC-3' (продукт 460 н.п.). Условие амплификации для *Beclin 1* (26 циклов): предварительная обработка 94 °С 2 мин, денатурация ДНК 94 °С 30 с, отжиг праймеров 62 °С 30 с, элонгация 72 °С 1 мин; для β-Actin (24 цикла): 94 °С 2 мин, 94 °С 20 с; 60 °С – 20 с; 72 °С – 45 с. Продукты амплификации анализировали после электрофореза в 1,5 % -ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в стандартной концентрации. Уровень экспрессии *Beclin 1* оценивали в относительных единицах оптической плотности (о.е.) с помощью программы «ImageJ» по отношению к уровню β-Actin.

## Результаты и обсуждение

Исследование было проведено на 5 клеточных линиях метастатической меланомы человека. В

предварительных исследованиях было показано, что клеточные линии *mel Kor* и *mel Mtp* имеют ген *B-RAF<sup>WT</sup>* "дикого" типа, а *mel Ibr* и *mel Z* – мутантный статус *B-RAF<sup>V600E</sup>*. Клеточная сублиния *mel MTP-cloneX* на наличие мутаций в гене *B-RAF* не тестирована.

Анализ модуляции аутофагии проводили после инкубации клеток с препаратами в концентрации 450 мкг/мл в течение 24 ч по изменению количества мРНК гена *Beclin 1*.

Предварительные результаты показали, что выживаемость клеток, инкубированных с аранозой-лио в концентрации 450 мкг/мл, составляет 50–76 %, тогда как при той же концентрации и инкубации с липосомальной аранозой выживает 39–52 % клеток (см. таблицу). Наличие мутаций в гене *B-RAF* не оказывало влияния на цитотоксичность аранозы в обеих лекарственных формах.

Для определения влияния двух лекарственных форм аранозы на процесс аутофагии проводили анализ экспрессии мРНК гена *Beclin 1*. Белок *Beclin 1* (Atg6) стимулирует аутофагию, участвуя в инициации образования аутофагосом.

Базальный уровень мРНК *Beclin 1* регистрировали в клетках 4 из 5 исследованных линий меланомы (*mel Mtp*, *mel Ibr*, *mel Kor*, *mel Z*), его величина варьировала от 0,19 до 0,49 о.е. Линия *mel Mtp clone X* имела минимальную базальную экспрессию мРНК *Beclin 1* (рис. 1), и в дальнейшем не анализировалась.

Способность клеточных линий к индукции аутофагии оценивалась по соотношению уровня мРНК *Beclin 1* в условиях 24-часовой инкубации с препаратами аранозы. При соотношении > 1 клеточную линию оценивали как способную к индукции аутофагии.

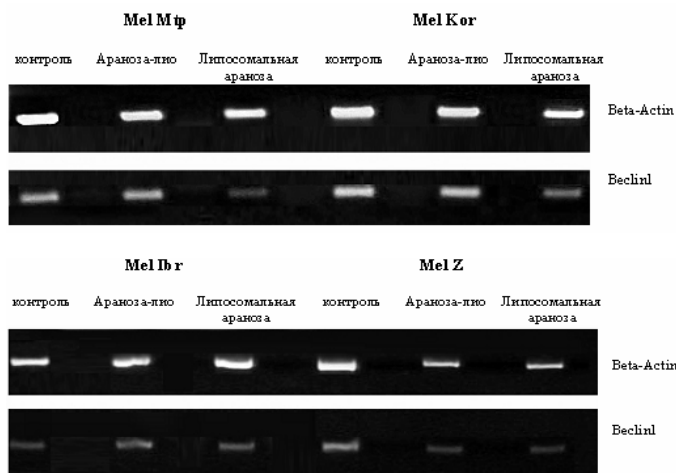
Араноза-лио блокировала аутофагию на одной из четырех клеточных линий меланомы. Значимое снижение экспрессии гена *Beclin 1* наблюдалось только на клеточной линии *Mel Z*. На клеточных линиях *mel Mtp*, *mel Ibr* араноза-лио вызывала статистически незначимую индукцию аутофагии в среднем на 0,1 о.е. (рис. 2, А и Б). Напротив, на клеточной линии *mel Kor* араноза-лио вызывала незначительное снижение аутофагии (рис. 2, В и Г).

Липосомальная араноза вдвое снижала экспрессию мРНК *Beclin 1* по сравнению с контролем на 3 клеточных линиях *mel Mtp*, *mel Z* и *mel Kor*. Только на клетках *mel Ibr* была отмечена незначительная индукция аутофагии (рис. 2).

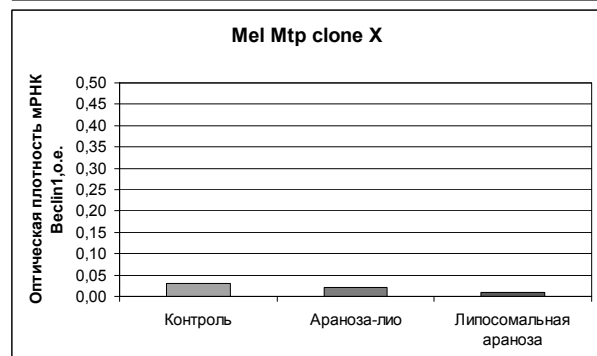
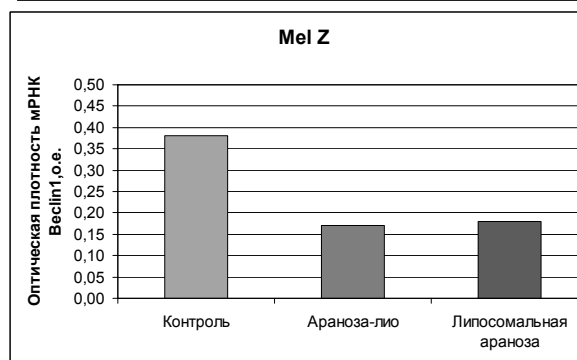
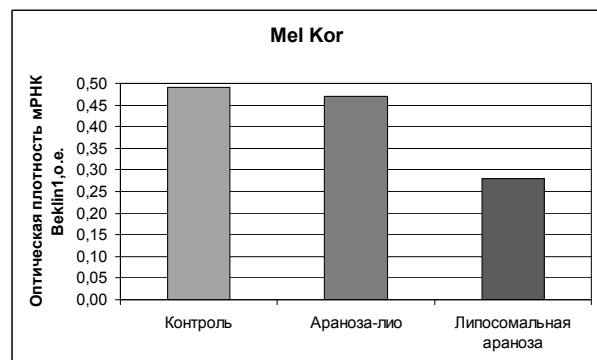
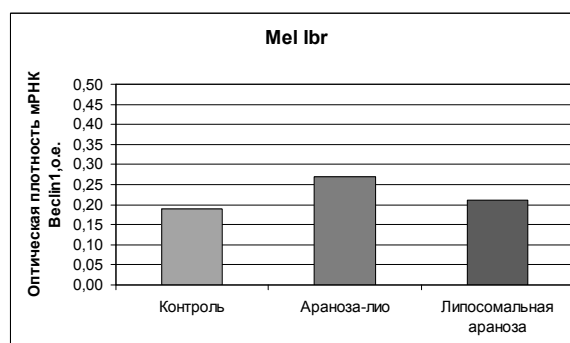
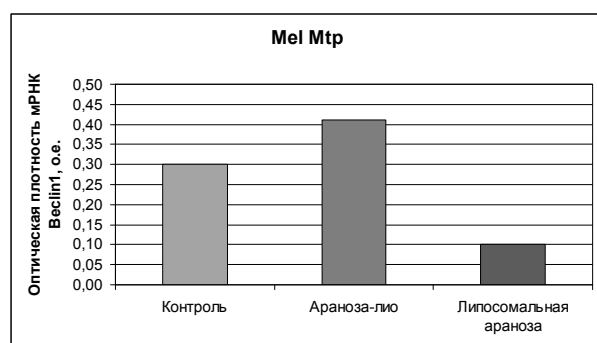
Таким образом, использование липосомальной аранозы подавляло аутофагию на клеточных линиях меланомы.

В настоящее время аутофагию большинством исследователей расценивают как стратегия защиты опухолевых клеток от гибели, вызываемой противоопухолевыми препаратами. Выступая в качестве основного механизма удаления поврежденных химиопрепаратами органелл и белков, аутофагия рассматривается как один из важных путей выживаемости опухолевых клеток. Предполагается, что ее ингибирование приведет к фатальным повреждениям в клетке, и, в конечном итоге, к массовой клеточной гибели.

Аутофагию и апоптоз часто наблюдают в одной клетке, в большей части случаев потому, что аутофагия предшествует апоптозу. Существует несколько молекулярных механизмов, обеспечивающих связь между аутофагией и апоптозом, так как часто они находятся под контролем множества общих сигнальных механизмов, они также могут взаимно регулировать друг друга.



**Рис. 1.** Электрофореграмма изменения уровня Beclin1 на клеточных линиях меланомы под влиянием аранозы-лио и липосомальной аранозы.



**Рис. 2.** Изменение экспрессии мРНК Beclin1 под влиянием Аранозы-лио и липосомальной аранозы на клеточных линиях *mel Mtp* (А), *mel Ibr* (Б), *mel Kor* (В), *mel Z* (Г) и *mel Mtp clone X* (Д)

Таблица

Модуляция аутофагии на клеточных линиях меланомы при инкубации с Аранозой-лио и липосомальной аранозой

Клеточная линия	Статус <i>B-RAF</i>	Араноза-лио		Липосомальная араноза	
		Выживаемость клеток, %	Изменение экспрессии Beclin 1	Выживаемость клеток, %	Изменение экспрессии Beclin 1
<i>Mel Kor</i>	<i>B-RAF</i> <sup>WT</sup>	50	0,9	41	0,6
<i>Mel Mtp</i>	<i>B-RAF</i> <sup>WT</sup>	70	1,4	52	0,3
<i>Mel Ibr</i>	<i>B-RAF</i> <sup>V600E</sup>	76	1,4	40	1,1
<i>Mel Z</i>	<i>B-RAF</i> <sup>V600E</sup>	60	0,4	39	0,5

Путем аутофагии может быть снижено количество проапоптотических белков в цитоплазме клетки. На более поздних стадиях с помощью аутофагии разрушается эффекторная каспаза-8. Если в клетках все-таки запускается апоптоз, в большинстве случаев включаются механизмы ингибирования аутофагии. Считается, что это необходимо для блокирования цитопротекторных функции аутофагии при усилении апоптотических сигналов. Большой частью механизмы блокирования включают каспаза-зависимое расщепление белков Atg3 и Beclin1. При определенных условиях активация апоптоза может сопровождаться усилением аутофагии.

Таким образом, существует тонко регулируемый диалог между аутофагией и апоптозом. Молекулярные механизмы, которые контролируют решение запустить один или оба этих процесса в ответ на специфические стимулы, остаются, в большей степени, неизвестными.

### Литература

1. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
2. Барышников А.Ю., Шихин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 58.
3. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бузова О.С. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
4. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Полозкова А.П. Влияние лекарственных форм аранозы на индукцию апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 64.
5. Барышникова М.А., Зангиева М., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
6. Грищенко Н.В., Барышникова М.А., Полозкова А.П. и др. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
7. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 49–54.
8. Ковалева О.В., Шитова М.С., Збаровская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? // Клиническая онкогематология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 103–13.
9. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
10. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
11. Лихаанцева В.Г., Оборотова Н.А., Когония Л.М. и др. Первый опыт применения аранозы в лечении увеальных меланом // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 34–9.
12. Матюшин А.А., Барышникова М.А., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Липосомы: организм, опухоль, клетка // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 6. – С. 3–10.
13. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
14. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
15. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
16. Оборотова Н.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов // Антибиотики и химиотерапия – 1991. – Т. 36, № 10. – С. 47.
17. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3–4. – С. 33–40.
18. Оборотова Н.А., Лопатин П.В. 30 лет лаборатории разработки лекарственных форм ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 3–7.
19. Полозкова С.А., Орел Н.Ф., Маркович А.А., Горбунова В.А. Химиотерапия аранозой в монорежиме и в комбинации с другими препаратами метастатических нейроэндокринных опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 42.
20. Полозкова С.А., Горбунова В.А., Орел Н.Ф., Маркович А.А. Клинический опыт применения аранозы в режиме монотерапии и в комбинации с капецитабином, темозоломидом и доксорубицином при метастатических нейроэндокринных опухолях // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12. – № 2. – С. 67.
21. Полозкова С.А., Степанова Е.В., Барышников А.Ю. и др. Экспрессия MGMT в опухолевой ткани при лечении пациентов с нейроэктодермальными опухолями режимами на основе аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 21–6.
22. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 27–33.
23. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.И. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена B-RAF на способность клеток меланомы к аутофагии // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – № 3. – С. 68–72.
24. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
25. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Tupitsin N.N. et al. CD95 (Fas/APO-1) antigen is a new prognostic marker of blast cells of acute lymphoblastic leukaemia patients / Book Editor(s): Kaspers, G.J.L.; Pieters, R.; Veerman, A.J.P. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III Book Series: Advances in Experimental Medicine and Biology? 1999. – 457 – P. 251–8.
26. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Zabolina T.N. et al. FAS(APO-1/CD95) antigen: new activation marker for evaluation of the immune status // Russian Immunological J. – 1997. – 2(2). – P. 115.
27. Deng R., Li W., Guan Z. et al. Acetylcholinesterase expression mediated by c-Jun-NH2-terminal kinase pathway during anticancer drug-induced apoptosis // Oncogene. – 2006. – 25. – P. 7070–7.
28. Galuzzi L., Vitale L., Abrams J.M. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 // Cell Death Differ. – 2012. – 19(1). – P. 107–20.
29. Michailova I.N., Morozova L.P., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – № 5. – P. 303–13.
30. Polosukhina E.R., Zabolina T.N., Shishkin Yu.V. et al. Studing of Fas(APO-1/CD95) antigen expression by flow cytometry with monoclonal antibodies IPO-4 // Experimental Oncology. – 1997. – 19(3). – P. 206–11.
31. Polosukhina E.R., Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. et al. Expression of antigen CD95(Fas/APO-1) mediating apoptosis in hemoblastosis using monoclonal antibodies ICO-160 // Hematology and transfusiology. – 2000. – 45(4). – P. 3–6.
32. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. CD95-deficient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis // Experimental Oncology. – 2001. – 23(3). – P. 175–81.
33. Vartanian A.A., Burowa O.S., Stepanova E.V. et al. The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // Melanoma Research. – 2007. – 11(1). – P. 1–8.
34. Vartanian A.A., Baryshnikov A.Yu. Crosstalk between apoptosis and antioxidants in melanoma vasculogenic mimicry // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2007. – 601. – P. 145–53.
35. Wong R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment // J/Exp Clin Cancer Res. – 2011. – 26. – P. 30–87.

### Заключение

Липосомы доставляют препарат в опухолевые клетки путем эндоцитоза, в результате чего не происходит контакта противоопухолевого препарата с клеточной мембраной, лекарственное вещество высвобождается из липосомы внутри клетки.

Снижение экспрессии мРНК Beclin1 под действием липосомальной аранозы может быть связано с тем, что препарат вызывает гибель клеток, запускает внутренний путь апоптоза, который, в свою очередь, подавляет аутофагию.

Изучение способности липосомальных форм препаратов влиять на механизмы аутофагии требует дополнительного изучения.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-33257 мол\_а\_вед.*

УДК 616.34/.35-006.6:578.52

П.В. Гольшико<sup>1,2</sup>, Д.В. Новиков<sup>3</sup>, С.В. Ананьев<sup>1</sup>, К.А. Барышников<sup>1</sup>, В.В. Новиков<sup>3</sup>**РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ ГЕНЫ В КРОВИ И ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**<sup>1</sup>ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва<sup>2</sup>ГКБ № 57, Москва<sup>3</sup>НИИ молекулярной биологии и регионарной экологии Нижегородского Государственного Университета им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород**Контактная информация**

Павел Викторович Гольшико, заведующий 6 онкологическим отделением ГКБ № 57

адрес: 105077 Москва, 11 Парковая ул. 32; тел. +7(495)305-23-05

e-mail: [golp@tut.by](mailto:golp@tut.by)

Статья поступила 02.02.2015, принята к печати 09.02.2015.

**Резюме**

РТА представляют собой группу опухоле-ассоциированных белков, экспрессия которых в норме ограничена только репродуктивными тканями взрослого человека и эмбриональными тканями. В других тканях РТА отсутствуют. При злокачественной трансформации наблюдается aberrантная гиперэкспрессия РТА и их генов. В работе определяли мРНК 20 наименований РТА в образцах опухоли и периферической крови 98 больных колоректальным раком. Среди них мРНК шести наименований генов семейства MAGEA – MAGE-A1, MAGE-A2 MAGE-A3 MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6 – определяемых одновременно с помощью метода, позволяющего выявлять общую для всех шести генов нуклеотидную последовательность мРНК; мРНК восьми генов семейства GAGE (GAGE1-8), также одновременно определяемых по общей для всех нуклеотидной последовательности, мРНК трех генов семейства SSX (SSX1, SSX2, SSX4), мРНК генов XAGE1, NY-ESO1 и мРНК гена MAGEC1. Обнаружено, что выявление мРНК раково-тестикулярных генов можно использовать в качестве мониторинговых тестов.

Наличие в крови больного колоректальным раком мРНК генов MAGE-C1 и XAGE1 может быть потенциальным маркером более благоприятного течения заболевания. В то же время, мРНК MAGE-A1-6, GAGE1-8 и SSX1; 2; 4 генов могут свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе.

**Ключевые слова:** раково-тестикулярные гены, колоректальный рак.P.V. Golyshko<sup>1</sup>, D.V. Novikov<sup>2</sup>, S.V. Anan'ev<sup>1</sup>, K.A. Baryshnikov<sup>1</sup>, V.V. Novikov<sup>2</sup>**A SEARCH FOR CANCER-TESTIS GENES EXPRESSION IN BLOOD AND BIOPSY OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER**<sup>1</sup>FSBSI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow<sup>2</sup>Municipal Hospital № 57, Moscow<sup>3</sup>Molecular Biology and Regional Ecology Institute of N.I. Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod**Abstract**

CTA are located in a group of tumor-associated proteins. In normal conditions their expression is limited to embryonic tissues and reproductive tissues of adults. In other tissues CTA are not exist. Interestingly, that the aberrant CTA overexpression is observed during malignant transformation. In this work we investigated the mRNA of 20 CTA genes overexpression in biopsy and peripheral blood of 49 patients. Among them a MAGE-A1, MAGE-A2 MAGE-A3 MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6 mRNAs were detected in same time by using originally primers, that specifically recognize MAGEA-conservative sequences. Similar system of primers was constructed for GAGE1-8 verification. Furthermore, the expression of SSX1, SSX2, SSX4, XAGE1, NY-ESO1 and MAGEC1 was identified. It is found that the detection of mRNA CTA-coding genes can be used as a monitoring test.

The presence of mRNA MAGE-C1 and XAGE1 genes in the blood of patients with colorectal cancer could be a potential marker of a more favorable course of the disease. In other hand, the existence of mRNA MAGE-A1-6, GAGE 1-8 and SSX1,2,4 genes may indicate a poor prognosis.

**Key words:** cancer-testis genes, colorectal cancer.**Введение**

РТА представляют собой группу опухоле-ассоциированных белков, экспрессия которых в норме ограничена только репродуктивными тканями взрослого человека и эмбриональными тканями. В других тканях РТА отсутствуют. При злокачественной трансформации наблюдается aberrантная гиперэкспрессия РТА и их генов [1; 2; 9; 12–15; 21–27; 30]. РТА служат как специфический таргетный антиген для иммунологической атаки рестриктированными по антигенам I класса CD8<sup>+</sup> Т-клетками

[5; 6; 8]. Экспрессия РТА на меланомных клеточных линиях учитывается при создании противоопухолевых вакцин. [3; 4; 7; 10; 11; 16–20; 29]. Являясь белками с ферментативными функциями и способностью вмешиваться во внутриклеточные сигнальные пути, РТА могут оказывать влияние на течение заболевания.

**Цель работы** – исследование профиля экспрессии раково-тестикулярных генов MAGE-A1-6, GAGE1-8, XAGE1, NY-ESO1 и SSX1; 2; 4 в крови и опухолевых очагах больных колоректальным раком.

### Материалы и методы

Для определения частоты встречаемости мРНК *MAGE-A1-6*, *MAGE-C1*, *GAGE 1-8*, *SSX1,2,4*, *NY-ESO-1*, и *XAGE1* генов использовали 98 образцов периферической крови и опухоли больных колоректальным раком, находившихся на лечении в отделении проктологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Средний возраст больных составил  $63 \pm 7$  лет. Постановка диагноза проводилась на основании клинического, морфологического, эндоскопического, рентгенологического обследования и по результатам оперативного вмешательства. Забор крови у больных колоректальным раком производили до операции и на 7 сутки после операции. Забор образца опухоли объемом  $1 \text{ мм}^3$  проводили во время операции. Контрольную группу составили 30 образцов периферической крови, взятой у клинически здоровых людей – доноров крови.

Тотальную РНК выделяли с использованием лизирующего буферного раствора, содержащего на 30 мл воды 50 г гуанидин тиоционата, 5 мл 1 М Трис-НСl, 20 мл 0,5 М ЭДТА. Затем добавляли 10,45 мл 20% саркозила и доводили объем водой до 106,25 мл. Непосредственно перед употребления добавляли  $\beta$ -меркаптоэтанол до 1%. Реакцию ПЦР обратной транскрипции определяли по стандартной методике. Последовательность использованных праймеров приведена в табл. 1. Синтез праймеров осуществляли в ООО НПФ «Литех» (Россия).

Гнездовую ПЦР проводили в два раунда, с использованием разных наборов праймеров, специфичных для мРНК каждого из тестируемых генов. В микроцентрифужную пробирку «Eppendorf» объемом 0,5 мл вносили 2,5 мкл десятикратного ( $10 \times$ ) буферного раствора для Taq-полимеразы, 2,0 мкл 8 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов (НПФ «Литех», Россия), 2,5 мкл смеси прямых и обратных праймеров следующего состава: *MMRP1* и *MAGE-R1*; *NY-R1* и *NY-F1*; *GP-R1*, *P-F1* и *G-F1*; *CT7-R1* и *CT7-F1*; *X-R1* и *X-F1*; *SSX4-5R1* и *SSX1-2F1*, 0,5 мкл раствора Taq-полимеразы в буфере для хранения (5 единиц активности в мкл), 15,5 мкл деионизированной воды и 2 мкл кДНК, полученной в результате проведения реакции обратной транскрипции. Реакционную смесь перемешивали, центрифугировали на вортекс-центрифуге «СМ 70 М-07 Sky Line» (ELMI, Латвия) и покрывали 1–2 каплями минерального масла (ICN Biomedicals, США). Затем проводили 35 циклов амплификации по следующей программе:  $94^\circ\text{C} - 30''$ ,  $55^\circ\text{C} - 30''$ ,  $72^\circ\text{C} - 30''$ .

Второй раунд гнездовой ПЦР проводили раздельно для каждого из раково-тестикулярных генов. В реакционную смесь вносили 2,5 мкл десятикратного ( $10 \times$ ) буферного раствора для Taq-полимеразы, 2,0 мкл 8 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов (НПФ «Литех», Россия), 1 мкл смеси прямых и обратных праймеров, индивидуальных для каждого гена, 0,5 мкл раствора Taq-полимеразы, 17 мкл деионизированной воды и 2 мкл смеси, полученной при проведении первого раунда ПЦР. Перемешивали с помощью вортекса «REAX top» (Heidolph, Германия), центрифугировали и покрывали 1–2 каплями минерального масла. Затем проводили 30 циклов амплификации по следующей программе:  $94^\circ\text{C} - 30''$ ,  $60^\circ\text{C} - 30''$ ,  $72^\circ\text{C} - 30''$ . Использовали амплификатор Терцик-2. Регистрацию результатов реакции проводили с помощью гель-электрофореза в 2 %-ной агарозе. ДНК визуализировали при длине волны 254 нм и доку-

ментировали с использованием системы обработки изображений «ViTran» («Биоком», Москва).

Для подтверждения полученных результатов и оценки специфичности реакции определяли нуклеотидную последовательность полученных фрагментов кДНК. Полученную кДНК элюировали из геля и использовали в реакции терминирования дидезоксинуклеозидтрифосфатами, меченными флюоресцентными красителями. Результаты реакции регистрировали в автоматическом режиме с использованием секвенатора ABI Prism 3130.

Уровень значимости полученных результатов оценивался при использовании критерия  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

#### *мРНК раково-тестикулярных генов в периферической крови и опухолевых очагах больных колоректальным раком*

В работе тестировали наличие в крови и образцах опухоли 98 больных колоректальным раком в стадиях  $T_{0-4}N_{0-2}M_{0-1}$  матричной РНК 20 наименований раково-тестикулярных генов. Среди них мРНК шесть наименований генов семейства *MAGEA* – *MAGE-A1*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-A5*, *MAGE-A6* – определяемых одновременно с помощью метода, позволяющего выявлять общую для всех шести генов нуклеотидную последовательность мРНК; мРНК восьми генов семейства *GAGE* (*GAGE1-8*), также одновременно определяемых по общей для всех нуклеотидной последовательности, мРНК трех генов семейства *SSX* (*SSX1*, *SSX2*, *SSX4*), мРНК генов *XAGE1*, *NY-ESO1* и мРНК гена *MAGEC1*.

Суммарная частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов *GAGE1-8*, *NY-ESO1*, *SSX1*; 2; 4, *MAGEC1*, *XAGE1a* и *b*, *MAGEA1-6* в образцах опухолевых очагов составила 86%. В периферической крови тех же больных до проведения операции суммарная частота обнаружения исследуемых мРНК составила 80 %. После проведения операции количество положительных образцов периферической крови у тех же больных возросло до 90 % (рис. 1).

В крови больных колоректальным раком на 5–7 сутки после операции выявлялось большее число наименований мРНК раково-тестикулярных генов, чем до операции. До операции в периферической крови больных колоректальным раком преимущественно выявлялась мРНК одного из исследуемых генов, и ни разу не было выявлено 6–7 мРНК раково-тестикулярных генов одновременно. В периферической крови больных после операции преимущественно детектировалось 2–4, а в некоторых образцах – 6–7 видов мРНК раково-тестикулярных генов. В образцах опухолевых очагов также чаще всего регистрировалось 2–4 формы мРНК раково-тестикулярных генов, и несколько образцов показали одновременное наличие 6–7 мРНК раково-тестикулярных генов.

Чаще всего в образцах опухолевых очагов выявлялись мРНК *SSX1*; 2; 4 и *MAGEA1-6* генов. Реже всего выявлялись мРНК *NY-ESO1*, *GAGE1-8* и *PAGE1* генов. В образцах периферической крови до операции у тех же больных преобладали мРНК *XAGE1* и *MAGEA1-6*. После проведения операции спектр выявляемых в периферической крови мРНК раково-тестикулярных генов изменился, стала наблюдаться картина, схожая с тем, что мы наблюдали в образцах клеток опухолевых очагов. Чаще выявлялись мРНК *SSX1*; 2; 4 и *MAGEA1-6* генов (табл. 2).

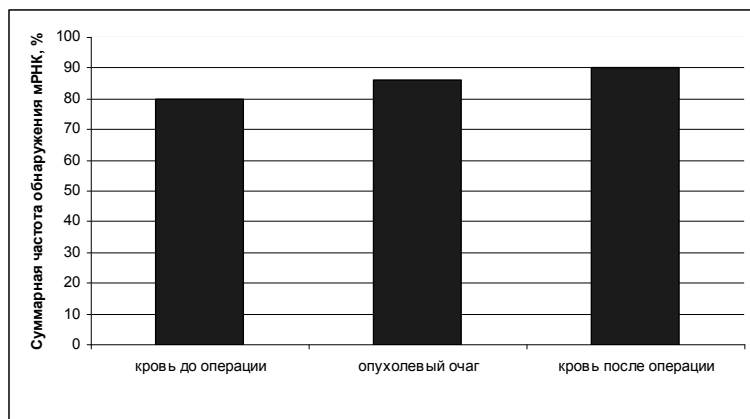


Рис. 1. Суммарная частота выявления мРНК РТГ в периферической крови больных КРР до/после операции и в образцах опухолевых очагов.

Таблица 1

Праймеры для выявления раково-тестикулярных антигенов

Название	Первичная структура (5'-3')
<i>NY1-2F1</i>	5'-AGAGCCGCTGCTTGAGTTC-3'
<i>NY2-3R1</i>	5'-TCTGCAGCAGTCAGTCGGAT-3'
<i>NY1-2F2</i>	5'-CCTGCTTGAGTTCTACCTCG-3'
<i>NY2-3R2</i>	5'-GCAGTCAGTCGGATAGTCAG-3'
<i>GF1</i>	5'-ATTGGGCCTATGCGGCCGA-3'
<i>PF1</i>	5'-CGTAGACCAATGATCTATGT-3'
<i>GPR1</i>	5'-TCCAACAYAGGAGCAGCCTG-3' (Y = T ИЛИ C)
<i>GPF2</i>	5'-AGCATCTGCAGSTCAAGGGC-3' (S = G ИЛИ C)
<i>GPR2</i>	5'-GCAATCACAGYSGTTAAAAGA-3'
<i>SSX1-2F1</i>	5'-GAGAAGATCCAAAAGGCCTT-3'
<i>SSX4-5R1</i>	5'-TTCTTGGGCATGATCTTCGG-3'
<i>SSX2-3F2</i>	5'-AGGCCATGACTAAACTAGGT-3'
<i>SSX3-4R2</i>	5'-TCTGAGGACGTTCAACCTGA-3'
<i>XF1</i>	5'-CTACTGAGACACGGCCGACA-3'
<i>XR1</i>	5'-TTGTTTCAGCTTGCTTCAT-3'
<i>XF2</i>	5'-ATACAGCTGAGATCCCAGTG-3'
<i>XR2</i>	5'-TTGTGGTTGCTCTTCACCTG-3'
<i>CTF1</i>	5'-CCTATCCAGTCTTCAAGGTG-3'
<i>CTR1</i>	5'-CAGGACAACCTCTGAGGACTC-3'
<i>CTF2</i>	5'-AGTGCCAGGAGTCAAGGTTTC-3'
<i>CTR2</i>	5'-GCATATCCTTGTCCTCCCATG-3'
<i>MMRP1</i>	5'-CTGAAGGAGAAGATCTGCC-3'
<i>Mage-R1</i>	5'-CACACTCAGCTCCTCCAGA-3'
<i>Mage-F</i>	5'-AGAAGATCTGCCWGTGGGTC-3' W = A ИЛИ T
<i>Mage-R2</i>	5'-GTGCTTGGCCCTCCTCTTC-3'

Таблица 2

Встречаемость мРНК раково-тестикулярных генов в периферической крови больных колоректальным раком до и после хирургического удаления опухоли

Ген	Частота обнаружения мРНК РТ генов		
	Периферическая кровь до операции (n=98)	Образцы опухолевых очагов (n=98)	Периферическая кровь через 7 дней после операции (n=98)
GAGE1-9	18% (18)	29% (28)	31% (30)
MAGEA1-6	33% (32)	55% (54)	35% (34)
MAGE-C1	25% (24)	10% (10)	21% (20)
XAGE1	29% (28)	33% (32)	29% (28)
SSX1,2,4	22% (22)	59% (58)	35% (34)
NY-ESO-1	14% (14)	33% (32)	12% (12)
мРНК не обнаружена	20% (20)	14% (14)	10% (10)
1 мРНК	41% (40)	14% (14)	33% (32)
2-4 мРНК	39% (38)	61% (60)	50% (48)
6-7 мРНК	0	10% (10)	7% (6)

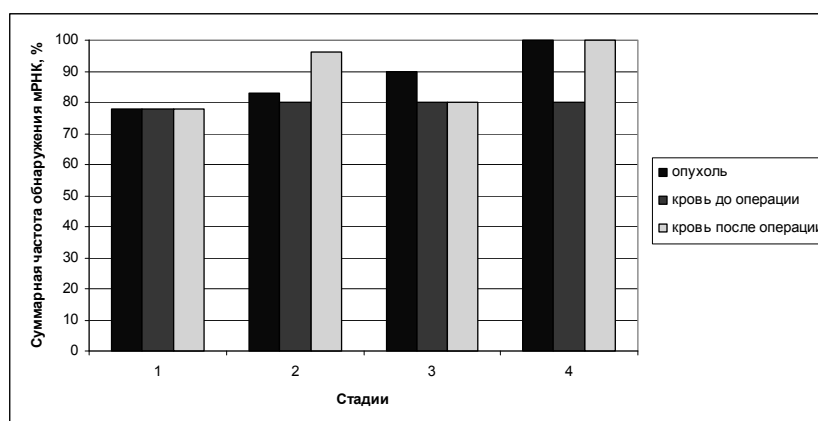


Рис. 2. Суммарная частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов на разных стадиях колоректального рака.

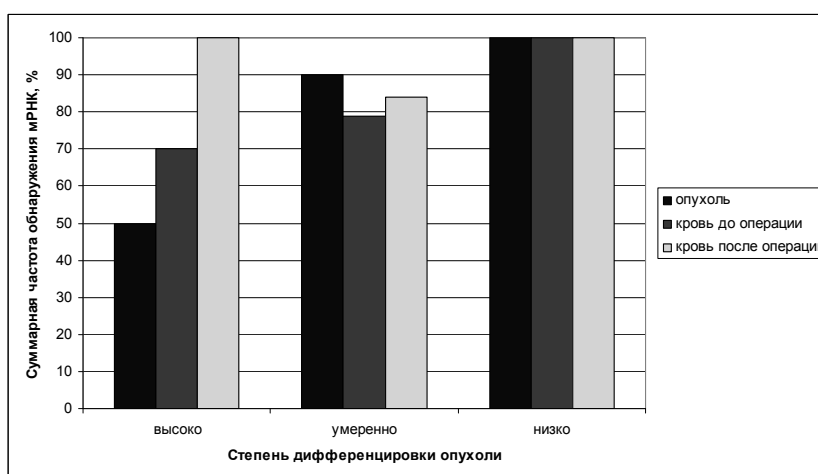


Рис. 3. Суммарная частота обнаружения мРНК РТГ генов при различной степени дифференцировки опухоли.

Индивидуальная встречаемость мРНК *GAGE1-8*, *NY-ESO1*, *SSX 1*; 2; 4 *MAGEC1*, *XAGE1*, *MAGEA1-6* была выше в тканях, чем в периферической крови больных колоректальным раком, причем как до, так и после операции, за исключением *MAGE-C1*. Максимально положительное число проб на *MAGE-C1* было зафиксировано в крови больных до операции (25%), несколько меньше (21%) – в крови после операции и минимальное количество положительных проб (10%) в опухолевых очагах.

#### Частота встречаемости мРНК раково-тестикулярных генов на разных стадиях заболевания

На первой стадии заболевания суммарная частота выявления мРНК раково-тестикулярных генов как в периферической крови, взятой до, так и после операции, а также в образцах опухолевых очагов составила 78% (14 из 18 образцов положительны). Начиная со второй стадии заболевания, суммарная частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов в образцах опухолевых очагов была выше, чем в образцах периферической крови, взятых до операции (рис. 2).

В то же время, образцы периферической крови, взятые после операции, были чаще положительными, чем образцы тех же больных, взятые до операции. На второй стадии заболевания позитивных образцов периферической крови больных колоректальным раком, взятых после операции, было даже выше, чем количество положительных образ-

цов опухолевых очагов.

Раздельно мРНК *GAGE1-8*; *NY-ESO1*; *SSX1*; 2; 4 *MAGEC1*, *XAGE1*, *MAGEA1-6* генов обнаруживались на всех стадиях заболевания. Для большинства мРНК было показано, что мРНК раково-тестикулярных генов до операции в образцах периферической крови выявлялась реже, чем в образцах периферической крови тех же больных после операции, или в образцах опухолевых очагов. При этом на всех стадиях заболевания, кроме третьей, мРНК *MAGEC1* выявлялась чаще в образцах периферической крови, чем в образцах опухолевых очагов. Только на третьей стадии позитивных образцов опухоли было выявлено больше, чем позитивных образцов периферической крови. Такая же картина была показана и для мРНК *XAGE1* на четвертой стадии. Матричная РНК *XAGE1* у больных колоректальным раком на четвертой стадии чаще выявлялась в крови больных до и после операции, чем в образцах опухоли. В периферической крови, взятой после операции, как правило, мРНК раково-тестикулярных генов выявлялась не реже, чем в образцах опухолевых очагов тех же больных.

#### Частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов при опухолях разной степени дифференцировки

Для образцов периферической крови, собранных до проведения операции, а также образцов клеток опухолевого очага, количество положительных проб было минимальным у больных, которые имели высокую степень дифференцировки опухо-

ли, а у больных с низкодифференцированной аденокарциномой мРНК *GAGE1-8*, *NY-ESO1*, *SSX1*; 2; 4, *MAGEC1*; *XAGE1*; *MAGEA1-6* генов выявлялась в 100 % образцов. Для пациентов с умереннодифференцированной аденокарциномой данные носили промежуточный характер (рис. 3).

После операции в образцах периферической крови, полученных от тех же больных с высокодифференцированной аденокарциномой мРНК *GAGE1-8*, *NY-ESO1*, *SSX1*; 2; 4, *MAGEC1*; *XAGE1*; *MAGEA1-6* генов были выявлены во всех случаях. При умеренной дифференцировке мРНК раково-тестикулярных генов выявлялись только в 84 % протестированных образцов, а при низкодифференцированной опухоли – в 100 % случаев.

При высокодифференцированной аденокарциноме в крови больных до операции наиболее часто выявлялись мРНК *MAGE-C1* и *XAGE1* – в 43 и 43% протестированных образцов. При умереннодифференцированной аденокарциномой мРНК *MAGE-C1* и *XAGE1* выявлялась реже (21 и 23 % случаев), при низкодифференцированной – в 25 и 25 % протестированных образцов периферической крови больных колоректальным раком, соответственно (рис. 3).

Для мРНК генов *MAGE-A1-6*, *GAGE1-8* и *SSX1*; 2; 4 обнаруживалась обратная тенденция. У больных с высокодифференцированной аденокарциномой мРНК *MAGE-A1-6*, *GAGE1-8* и *SSX1*; 2; 4 выявлялась в 29; 14 и 14 % случаев соответственно, при умеренно дифференцированной карциноме – в 31; 13 и 18 % случаев, соответственно. Максимально часто мРНК этих генов выявлялись в периферической крови больных колоректальным раком при низкодифференцированных опухолях, обладающих всеми характеристиками злокачественной опухоли в максимальной степени. Матричная РНК генов *MAGE-A1-6*, *GAGE1-8* и *SSX1*; 2; 4 выявлялась в крови этих больных в 50; 25 и 75 % протестированных образцов. Матричная РНК *NY-ESO1* выявлялась только в периферической крови больных с умереннодифференцированной аденокарциномой (18 % случаев). В крови больных с высоко- и низкодифференцированной аденокарциномой мРНК *NY-ESO1* не обнаруживалась.

В образцах клеток опухолевых очагов мРНК *MAGE-A1-6* реже всего выявлялась при высокодифференцированной аденокарциноме (50 %). При умеренно дифференцированной карциноме она обнаруживалась в 55% случаев, при низкодифференцированной – в 75 % случаев. Для мРНК *SSX1*; 2; 4 генов была показана обратная тенденция. При высокодифференцированной опухоли мРНК *SSX1*; 2; 4 генов была обнаружена в 67 % образцов опухолевых очагов. При умеренно и низкодифференцированной опухоли – в 61 и 50 % случаев соответственно. Матричная РНК *GAGE1-8* детектировалась только при умеренно- и низкодифференцированной опухоли (34 и 25 % случаев соответственно). При высокодифференцированной опухоли она не была выявлена ни в одном случае (0 %).

Матричная РНК *MAGE-C1* выявлялась только при умереннодифференцированных опухолях (13 % случаев), мРНК *XAGE1* выявлялась при высоко и умеренно дифференцированной аденокарциноме в 50 и 29 % случаев соответственно. В образцах опухолевых очагов мРНК гена *NY-ESO1* выявлялась на всех стадиях дифференцировки: в 17 % случаев при высокодифференцированной аденокарциноме, в 37 % случаев при умереннодифференцированной опухоли и в 25 % случаев – при низкой степени дифференцировки.

После проведения операции в периферической крови больных с высокодифференцированной аденокарциномой чаще всего (в 57 % случаев) обнаруживалась мРНК *XAGE1*. При умеренно- и низкодифференцированных опухолях она выявлена в 18 и 25 % образцов соответственно. Так же часто (в 50 % случаев) в периферической крови после операции у больных с высокодифференцированной аденокарциномой выявляли мРНК *MAGE-A1-6*, *GAGE1-8*. Матричные РНК *SSX1*; 2; 4; *NY-ESO1* и *MAGEC1* выявлялись реже (в 33; 17 и 33 % случаев соответственно). После операции мРНК генов *MAGE-A1-6* и *NY-ESO1* в периферической крови не выявлялись при низкодифференцированной аденокарциноме. При умеренной степени злокачественного перерождения частота выявления таких мРНК составила 37 и 18 % соответственно.

Частота выявления мРНК *GAGE1-8*, *SSX1*; 2; 4 и *MAGEC1* в периферической крови больных с умереннодифференцированной аденокарциномой после операции составила 26; 34 и 18 % соответственно. При низкодифференцированной – 50; 50 и 25 % соответственно.

#### **Матричная РНК раково-тестикулярных генов при наличии метастазов**

У 30 из 98 больных колоректальным раком выявлены метастазы в регионарных лимфатических узлах. У 5 человек выявлены метастазы в печень. Наличие регионарных и отдаленных метастазов не оказывало влияния на суммарную встречаемость мРНК раково-тестикулярных генов. Матричная РНК генов *MAGE-A1-6*, *MAGE-C*, *XAGE*, *NY-ESO*, *GAGE* и *SSX* была выявлена в 64 из 68 (94 %) образцах опухолевых очагов больных колоректальным раком без метастазов и в 28 из 30 образцов (93 %) опухолевых очагов больных с выявленными регионарными метастазами. У всех пяти больных, имеющих отдаленные метастазы в печень, была выявлена мРНК раково-тестикулярных генов в опухоли и периферической крови (100 %), при отсутствии метастазов в печень мРНК раково-тестикулярных генов выявлялась в 74 из 88 образцов опухолевых очагов и периферической крови (84 %). Различия в частоте выявления мРНК раково-тестикулярных генов были статистически не значимы ( $p > 0,05$ ). Отличий в экспрессии отдельных раково-тестикулярных генов у больных с метастазами и без метастазов также выявлено не было, что, вероятно, связано с ограниченным количеством образцов для анализа. Наши данные согласуются с таковыми Р.М.S Alves et al. [22], которые при исследовании 41 первичной опухоли и 14 метастазов колоректального рака не обнаружили повышения экспрессии РТА при метастазировании. Однако М. Li et al. [28] сообщают, что экспрессия мРНК *NY-ESO-1* коррелирует со стадией заболевания и метастазированием.

#### **Выводы**

1. Выявление мРНК раково-тестикулярных генов можно использовать в качестве мониторинговых тестов.
2. Наличие в крови пациента, страдающего колоректальным раком, мРНК генов *MAGE-C1* и *XAGE1* может быть потенциальным маркером более благоприятного течения заболевания. В то же время, мРНК генов *MAGE-A1-6*, *GAGE1-8* и *SSX1,2,4* могут свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе.



## Литература

1. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе // *Терапевтический архив*. – 2004. – Т. 76. – С. 77–81.
2. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Мисюрин А.В. и др. Экспрессия гена PRAME при миеломной болезни // *Терапевтический архив*. – 2004. – Т. 76. – С. 35.
3. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербakov А.И. и др. Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины // *Иммунология*. – 2014. – № 6. – С. 317–21.
4. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
5. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // *Практическая онкология*. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
6. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // *Бюллетень Сибирского отделения РАМН*. – 2004. – № 2. – С. 59–63.
7. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // *Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева*. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
8. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Петенко Н.Н. Современные проблемы биотерапии опухолей // *Вестник Московского Онкологического Общества*. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
9. Гапонова Т.В., Менделеева Н.П., Мисюрин А.В. и др. Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME/WT1 и XIAP у больных множественной миеломой // *Онкогематология*. – 2009. – № 2. – С. 59–63.
10. Дюкалова М.Б. Противоопухолевые вакцины на основе опухолевых клеток и их производных // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 3–8.
11. Ковалевский Д.А., Михайлова И.Н., Вишневецкая Я.В. и др. Экспрессия генов раково-тестикулярных антигенов в первичной меланоме кожи человека // *Вестник РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН*. – 2011. – Т. 21, № 2. – С. 52–65.
12. Мисюрин В.А. X-хромосомные раково-тестикулярные гены // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 3–10.
13. Мисюрин В.А. Аутомные раково-тестикулярные гены // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 77–82.
14. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RARA в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 9–16.
15. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Лукина А.Е. и др. Профили экспрессии раково-тестикулярных антигенов в клеточных линиях меланомы // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2014. – Т. 31, № 2. – С. 104.
16. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека // *Сибирский онкологический журнал*. – 2010. – № 1(37). – С. 29–39.
17. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // *Вестник РАМН*. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
18. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
19. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Багирова Н.С. и др. Стерилизация многослойных протеолипосом // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 13–8.
20. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение уровня экспрессии HSP70 на клеточных линиях меланомы // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–8.
21. Шумилова С.В., Перенков А.Д., Сахарнов Н.А. и др. Особенности экспрессии генов дифференцировочных молекул в клеточных линиях, полученных от больных раком толстого кишечника // *Вестник Нижегородского Университета им.Н.И. Лобачевского*. – 2012. – № 2–3. – С. 241–5.
22. Alves P.M.S., Levy N., Bouzourene H. et al. Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2007. – 56. – P. 839–47.
23. Figueiredo D.L.A., Mamede R.C.M., Spagnoli G.C. et al. High expression of cancer testis antigens MAGE-A, MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, NY-SES0-1, and GAGE in advanced squamous cell carcinoma of the larynx // *Head and Neck*. – 2011. – DOI 10.
24. Grizzi F., Franceschini B., Hamrick C. et al. Usefulness of cancer-testis antigens as biomarkers for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma // *J. of Translational Medicine*. – 2007. – 5. – P. 3.
25. Hanafuse T., Mohamed A.E.A., Domae S. et al. Serological identification of Tektin5 as a cancer/testis antigen and its immunogenicity // *BMC Cancer*. – 2012. – 12. – P. 520.
26. Kin Y., Jeoung D. The cancer/testis antigen CAGE induces MMP-2 through the activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 // *BMB*. – 2009. – 42(11). – P. 758–63.
27. Koop A., Sellami N., Adam-Kinges S. et al. Down-regulation of the cancer/testis antigen 45(CT45) is associated with altered tumor cell morphology, adhesion and migration // *Cell Communication and Signaling*. – 2013. – 11. – P. 41.
28. Li M., Yuan Y.-H., Han Y. et al. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue // *Clinical Cancer Research*. – 2005. – 11. – P. 1809–14.
29. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // *Melanoma Research*. – 2008. – № 5. – P. 303–13.
30. Smith H.A., McNeel G.G. The SSX family of cancer-testis antigens as target proteins for tumour therapy // *Clinical and Development Immunology*. – 2010. – ID150591.

УДК 616-006.831-085.2/.3:578.826:576.533

И.В. Уласов<sup>1</sup>, Н.В. Каверина<sup>2</sup>, А.Ю. Барышников<sup>2</sup>**ИНГИБИТОР КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА P53  
ПОЗИТИВНО РЕГУЛИРУЕТ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ  
ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВЕКТОРА В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ**<sup>1</sup>Центр опухолей головного мозга, Шведский медицинский центр, Сиэтл, США<sup>2</sup>ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им Н.Н. Блохина», Москва**Контактная информация**

Уласов Илья Валентинович, к.б.н., ведущий сотрудник центра лечения опухолей головного мозга

адрес: 550 17<sup>th</sup> Avenue, suite 570, Seattle, Wa, 98122, USA; тел. +1-206-991-2053

e-mail: ulasov75@yahoo.com

Статья поступила 03.10.2014, принята к печати 24.11.2014.

**Резюме**

Резистентность мультиформных глиобластом требует создания новых подходов для терапии опухолей головного мозга. Белок P53 – один из главных клеточных онкогенов, чья экспрессия увеличена в 50% клеток глиобластом. Эффект ингибитора P53 был изучен в присутствии онколитического аденовируса, и темодала, демонстрирующих противоопухолевый эффект на глиобластомных моделях. В клетках U87 глиобластомы человека мы обнаружили аддитивный эффект между ингибированием P53, активностью аденовирусного вектора и противоопухолевой активностью алкилирующего химиопрепарата темодал, выражающийся в увеличенной опухолевой токсичности. Оказалось, что ингибирование P53 химическим реагентом PFTa вызывает активацию аутофагии, одного из вариантов клеточной смерти. Таким образом, данная терапевтическая комбинация может представлять один из возможных способов увеличения противоопухолевого эффекта онколитического вируса.

**Ключевые слова:** аденовирус, P53, аутофагия, пролиферация.I.V. Ulasov<sup>1,2</sup>, N.V. Kaverina<sup>2</sup> and A.Yu. Baryshnikov<sup>2</sup>**SUPPRESSION OF CELLULAR P53  
PROMOTES CYTOTOXICITY OF ONCOLYTIC VECTOR  
AT THE MODELS OF HUMAN GLIOBLASTOMA**<sup>1</sup>The Center for Advanced Brain Tumor Treatment, Swedish Medial Center, Seattle, USA<sup>2</sup>FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow, Russia**Abstract**

Glioblastoma multiforme resistance requires a new approach for glioma therapy. Protein p53 is one of the main cellular oncogene, overexpressed in 50% of brain tumor cases. Impact of p53 attenuation was evaluated in the presence of oncolytic adenovirus and temodar, which exhibit anti-glioma effect using *in vitro* glioma models. Using U87 human glioma cells we observed an additive effect between alkylated chemotherapeutic agent temodar and oncolytic adenovirus which results into p53 inhibition. It occurs that attenuation of p53 using PFTa inhibitor, significantly prolongs cell death type II- autophagy and, therefore improves effect mediated by autophagy induced agents. In conclusion, combination of PFTa and temodar might represent a powerful therapeutic combination which sensibilises glioma cells to the infection with oncolytic vector.

**Key words:** adenovirus, p53, autophagy, proliferation.**Введение**

Глиобластома является самой распространенной формой опухолей ЦНС [1; 2; 4]. В последние годы произошел существенный прогресс в понимании механизма резистентности глиом к текущей терапии. Так, недавние исследования, проведенные группой Galvin-Burgess, показали, что глиобластомы представляют собой гетерогенную популяцию клеток, имеющих различный фенотип [6]. Одной из таких фенотипических характеристик является активация генетических программ, регулирующих клеточные сигнальные пути, такие как ангиогенез и клеточное деление. Клеточный белок P53 относится к группе белков, регулирующих клеточный гомеостаз [7].

Химиотерапия – один из видов противоопухолевой терапии, применяемой в лечении глиобластом. Несмотря на широкое применение, отсутствие селективности по отношению к опухолевым клеткам снижает эффективность терапевтических

интервенций и влияет на выживаемость пациентов. Похожая проблема ассоциирована с препаратом направленного действия против клеточного белка P53. Оказалось, что, несмотря на сниженную способность химических ингибиторов белка P53 проникать через гипоталамо-гипофизарный барьер, продолжительный курс химиотерапии с использованием P53-ингибитора повышал противоопухолевый эффект.

Таким образом, ведется поиск новых терапевтических путей, повышающих эффективность химиотерапии и снижающих побочный токсический эффект по отношению к здоровым клеткам.

Комбинирование химиотерапии с терапией онколитическими векторами является одним из методов, который нашел свое экспериментальное подтверждение в противоопухолевой терапии. В настоящее время в мире созданы несколько прототипов генно-инженерных вакцин на основе ОН-ВИР, имеющих ограниченную репликацию в нормальных клетках, но способных вызывать клеточ-

ную смерть клеток-мишеней [8; 9]. Так, одной из таких конструкций является вектор CRAd-s-pK7, который эффективно инфицировал клетки глиобластомы и вызывал токсичность, ассоциированную с развитием как апоптоза, так и аутофагии. Высокая продукция вирусных частиц инфицированной клеткой способствовала терапевтическому эффекту на неопластических клетках.

**Целью настоящей работы** являлось изучение терапевтического эффекта между онколитическим вирусом, темодалом и ингибированием P53.

### Материалы и методы

#### Клетки и клеточные линии

Эмбриональные клетки почки эмбриона человека HEK293, человеческие клетки глиобластомы N10 и U87, и клетки аденокарциномы человека A549 были получены из японской (Токуо, Япония) и американской коллекции клеточных линий (ATCC, Manassas, VA).

Клетки были выращены в Дульбеко модифицированной среде Игла (DMEM; Life Technologies), содержащей 10 % ТЭС (фетальной бычьей сыворотки); GIBCO-Life Technologies, США), 2 mM L-глутамин, 100 IU/мл пенициллина, 50 IU/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки культивировали при температуре +37 °C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>.

#### Реагенты

Темодал (Temozolomide), ингибитор клеточного P53 (PFTalpha), 2 %-ный водный раствор АО и PI, 1 мг/мл были получены из компании Sigma-Aldrich (США).

В качестве растворителя для темодара и ингибитора P53 использовали ДМСО с целью получения 100µM раствора темодала [10] и 20mM раствора PFTa (1000× раствор, [11]).

#### Вирусные вектора

Постоянно реплицирующийся компетентный аденовектор CRAd-S-pK7 был получен путем гомологической рекомбинации с SpeI-обработанной плазмидой, кодирующей полноразмерный геном аденовируса, содержащего 7 аминокислотных остатков полилизина, вклинённых в С-терминальный конец гена полноразмерного белка фибера типа 2 аденовирусов, с E1-pSurvivin шаттл плазмидой. Вирусная конструкция была получена путем трансфекции клеток HEK293 плазмидой. CRAd-S-pK7-вирус был наработан в клетках A549 и тестирован с использованием Adeno Titer X kit (Clontech, Mountain View, Ca, USA).

#### Тест для определения пролиферации клеток (MTT-тест)

Опухолевые клетки культивировали при температуре +37 °C в присутствии 5 % CO<sub>2</sub> в среде DMEM, содержащей 2 mM L-глутамин и 10 % ТЭС («Atlanta Bio», Atlanta, США). Клетки, достигшие логарифмической фазы роста, пассировали в плоскостонные 96-луночные микропланшеты («Costar», США) по 5 000 – 6 000 клеток на лунку и инкубировали в указанных выше условиях в течение 24 ч перед добавлением тестируемого вещества.

Для определения цитотоксичности клеточные линии были инфицированы CRAd-S-pK7-вектором в разной множественности инфекции. Через 72 ч после инфекции 200 микролитров MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

было добавлено к каждой лунке для дальнейшей инкубации. Спустя 4 ч после инкубации при 5 % CO<sub>2</sub> при +37 °C, к каждой лунке добавили 0,1 мл ДМСО для ингибирования метаболической реакции и разрушения формазана активно делящимися клетками.

Оптическое поглощение было измерено при λ 540 нм. Жизнеспособность клеток определяли по исключению красителя трипанового синего (Fisher Scientific США).

#### Цитологический метод окрашивания клеток, имеющих фрагментацию ДНК

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) был произведен согласно рекомендациям фирмы-производителя Roche (США) для набора In situ cell death Detection kit.

#### Анализ экспрессии белков с помощью вестерн блоттинга

Клетки, выращенные в 6-луночном планшете, были затем обработаны темодалом, инфицированы онколитическим вирусом CRAd-S-pK7 (5 IU/мл), или в комбинации темодал-ОНВИР в присутствии или отсутствии ингибитора PFTa. Через 72 ч после начала эксперимента клетки были лизированы в буфере, содержащем 50mM HEPES; 0,15 M NaCl, 0,5 %-ный Nonidet P-40 и смесь протеиназных ингибиторов. Белковые фракции были исследованы в 10 %-ном ПААГ-геле и перенесены на поливинилиден дифлуорид мембрану (PVDF, Bio-Rad, США). Мембраны были проинкубированы с первичными антителами P53 (клон DO-1), E1A (клон M58) и Актин (клон с-2), указанные антитела были получены из компании Santa Cruz Biotechnology (Техас, США).

Связанные первичные антитела были детектированы со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена Santa Cruz Biotechnology (Техас, США). Детекция белковых фракций была произведена с помощью реакции хемилюминесценции согласно инструкции (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США).

#### Определение клеточного деления и аутофагии

##### с помощью иммунофлуориметрии

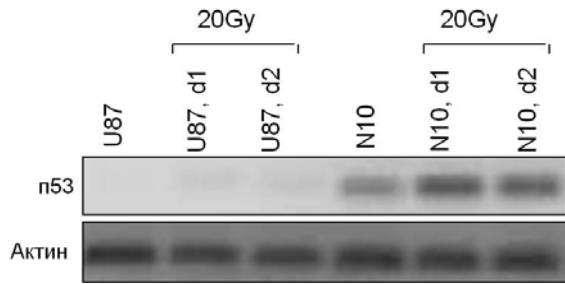
Анализ клеточного деления был проведен с использованием АО или PI. Клетки, обработанные темодалом, инфицированные онколитическим вирусом CRAd-S-pK7 (5 IU/мл), или в комбинации темодал-ОНВИР в присутствии или отсутствии ингибитора PFTa были центрифугированы.

Затем часть клеточного осадка была дважды промыта в фосфатно-солевом буфере и зафиксирована в 70 %-ном этаноле перед окраской PI (50 mg/мл) на 4 ч. Вторая часть осадка была окрашена раствором АО.

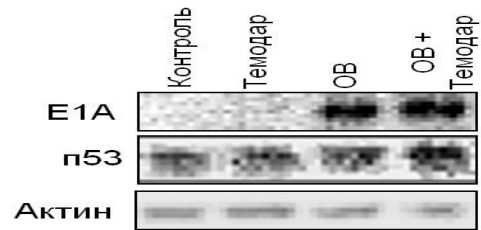
Анализ распределения клеток по фазам клеточного деления был осуществлен с помощью проточной цитофлуориметрии. Данные были получены после анализа 10 000 клеточных событий.

#### Статистический анализ

Результаты представлены в виде стандартного значения ± стандартное отклонение. Статистический анализ был выполнен с использованием теста Стьюдента (SPSS 13.0 программа, Чикаго, Иллинойс, США). Разница меньше 0,05 означала существенное различие.

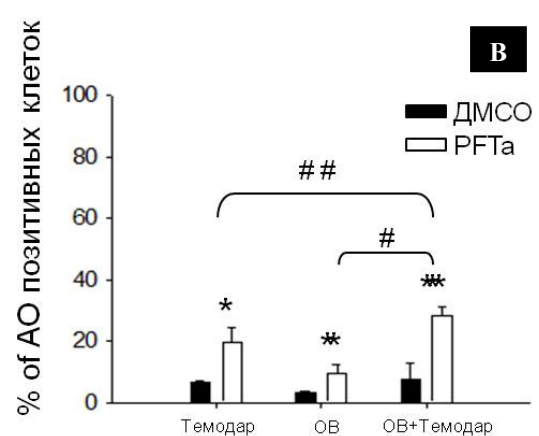
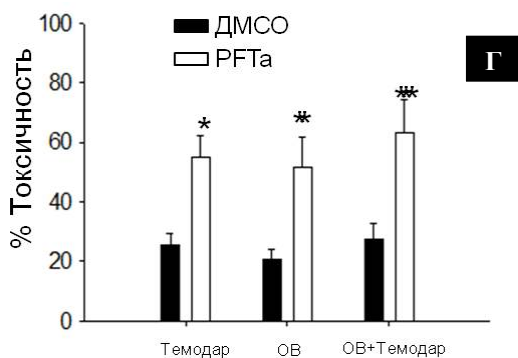
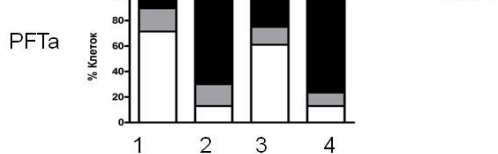
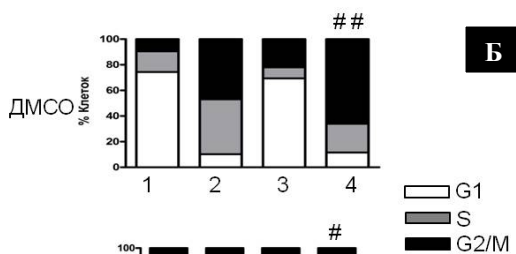
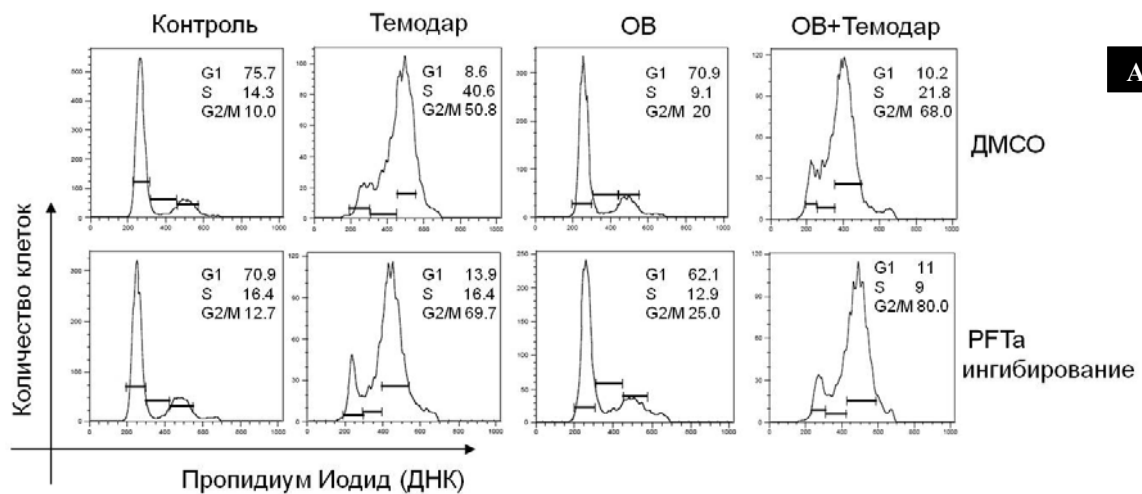


**Рис. 1.** Вестерн блоттинг анализ экспрессии белка P53 в клеточных лизатах U87 и N10 глиобластом человека в условиях нормального роста клеток и после облучения ионизирующим излучением.



**Рис. 2.** Влияние индукции клеточного белка P53 на клеточную токсичность:

Б – белковые фракции клеток глиомы человека U87, инфицированных ОНВИР, обработанных темодалом, или комбинацией ОНВИР+темодал, были проанализированы с помощью вестерн-блотта с антителами к Актину, P53 и аденовирусной области E1A белка (клон M58).



**Рис. 3.** Ингибирование клеточного P53 повышает чувствительность опухолевых клеток к терапии темодалом в комбинации с ОНВИР:

А – распределения клеточных популяций по фазам клеточного деления в присутствии ингибитора P53; Б – график анализа клеточной пролиферации после обработки клеток ингибитором P53 в присутствии ОНВИР и темодала, “#” и “##”  $p < 0,05$ ; В – повышение уровня аутофагии в клетках после обработки ингибитором P53 в присутствии ОНВИР и темодала; Г – трипан<sup>+</sup> клетки в образцах с ингибитором P53, обработанных темодалом и ОНВИР. “\*”, “\*\*”, “\*\*\*”, “\*\*\*\*”  $p < 0,05$  в сравнении с ДМСО обработанными образцами, “#” и “##” в сравнении с темодалом и ОНВИР обработанными образцами.

## Результаты и обсуждение

### Функциональная характеристика клеточного P53

Эксперимент по индукции экспрессии белка P53 в модификации [3; 12] проводили в частоте 0–20 Грей [3; 12]. Клетки были собраны для анализа экспрессии белка через 24 и 48 ч после облучения ионизирующей радиацией. На рис. 1 показано, что ионизирующее излучение увеличивало экспрессию P53 только в клетках опухоли головного мозга N10, но не в клетках опухоли U87. Полученные результаты согласуются с данными литературы [3] и свидетельствуют об отсутствии в этих клетках P53 "дикого" типа. В то же самое время, ионизирующее излучение вызывало индукцию P53 в клетках N10, что свидетельствует о мутантном типе гена P53. По данным литературы, увеличение P53 в клетках глиобластом U87 не приводило к возрастанию белка P21, для которого P53 является индуцирующим регулятором клеточного деления [5].

### Комбинация терапевтических подходов вызывает активацию клеточного P53

Наши предыдущие исследования показывают, что присутствие P53 снижает эффективность виротерапии с использованием CRAd-S-pK7 вектора [10]. Более того, наши недавние предварительные результаты позволяют предположить, что P53 также негативно влияет на активность темодала, нашедшего широкое применение в клинической практике при лечении глиобластом человека. Поскольку наша рабочая гипотеза позволяет предположить, что экспрессия P53 препятствует антиглионому эффекту CRAd-S-pK7-вектора и темодала, мы ингибировали экспрессию P53 в клетках глиобластомы человека U87 с помощью химического ингибитора PFTalpha.

Мы обрабатывали клетки, содержащие P53 "дикого типа", темодалом, или ОНВИР CRAd-S-pK7, или их комбинацией (темодал+ОНВИР). Через 72 ч клетки окрашивали с помощью TUNEL и определяли число CRAd-s-pK7-клеток по цитоплазматическому окрашиванию аденовирусных белков области E1A (рис. 2А; см. вклейку). Оказалось, что комбинация темодал+ОНВИР существенно увеличивала количество поврежденных клеток глиобластомы по сравнению с обработкой темодалом или ОНВИР по отдельности.

Более того, высокий уровень токсичности соответствовал высокому уровню P53 в этих клетках (рис. 2, Б).

## Литература

1. Уласов И.В., Каверина Н.В., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Антиглиомазная аденовирусная виротерапия: механизм, регуляция и клинические перспективы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, №2. – С. 11–8.
2. Уласов И.В., Тусон А., Барышников А.Ю. Белок фибера аденовируса человека обеспечивает стабильность вирусных капсидов // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 51–5.
3. Badie B., Goh C.S., Klaver J., Herweijer H., Boothman D.A. Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells // Cancer Gene Ther. – 1999. – 6. – P. 155–62.
4. Bao S., Wu Q., McLendon R.E. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // Nature. – 2006. – 444. – P. 756–60.
5. el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E. et al. WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppression // Cell. – 1993. – 75. – P. 817–25.
6. Galvin-Burgess K.E., Travis E.D., Pierson K.E., Vivian J.L. TGF-beta-superfamily signaling regulates embryonic stem cell heterogeneity: self-renewal as a dynamic and regulated equilibrium // Stem Cells. – 2013. – 31. – P. 48–58.
7. Kremenetskaya O.S., Logacheva N.P., Baryshnikov A.Yu. et al. Distinct effects of various p53 mutants on differentiation and viability of human K562 leukemia cells // Oncology Research. – 1997. – 9. – P. 155–66.
8. Ulasov I.V., Tyler M.A., Rivera A.A. et al. Evaluation of E1A double mutant oncolytic... // J Med Virol. – 2008. – 80. – P. 1595–603.
9. Ulasov I.V., Zhu Z.B., Tyler M.A. et al. Survivin-driven and fiber-modified oncolytic adenovirus exhibits potent antitumor activity in established intracranial glioma // Hum Gene Ther. – 2007. – 18. – P. 589–602.
10. Ulasov I.V., Sonabend A.M., Nandi S. et al. Combination of adenoviral virotherapy and temozolomide chemotherapy eradicates malignant glioma through autophagic and apoptotic cell death in vivo // Br J Cancer. – 2009. – 100. – P. 1154–64.
11. Xu G.W., Mymryk J.S., Cairncross J.G. Pharmaceutical-mediated inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to BCNU and temozolomide // Int J Cancer. – 2005. – 116. – P. 187–92.
12. Yamashita K., Nakashima S., You F. et al. Overexpression of immediate early gene X-1 (IEX-1) enhances gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cell line, U87-MG. // Neuropathology. – 2009. – 29. – P. 20–4.

Поскольку функциями клеточного белка P53 являются транскрипционная регуляция клеточного цикла и контроль за клеточной реакцией на повреждение ДНК, мы предположили, что ингибирование P53 может усилить цитотоксическую реакцию в клетках глиобластомы U87.

### Ингибирование P53 повышает активность ОНВИР и темодала

Как оказалось, в соответствии с нашей гипотезой ингибирование клеточного P53 не нарушало деления клеток U87 (рис. 3, А). При этом оказалось, что ингибирование P53 усиливало эффект темодала, ОНВИР и комбинации темодал+ОНВИР, что выразилось в накоплении клеток в состоянии G<sub>2</sub>– и M–фаз клеточного цикла (рис. 3, Б). Чтобы определить, привело ли нарушение клеточного деления ингибитором P53 к клеточной смерти, мы проанализировали клетки в реакции клеточной пролиферации. Как оказалось, ингибирование P53 также приводило к нарушению клеточной пролиферации.

По нашим данным, в среднем в 2–3 раза по отношению к клеткам, обработанным ДМСО, ингибирование P53 усиливало активность темодала (с 25,2 до 55,8 %), ОНВИР (с 18,2 до 49,4 %) и их комбинации (с 24,1 до 63,8 %, p<0,05; рис. 3, Б).

По результатам наших исследований, увеличение клеточной токсичности при применении темодала привело к активации аутофагии. Поскольку активация аутофагии может служить как защитным механизмом, так и механизмом клеточной смерти, с целью детекции аутофагосом с двойной мембраной мы окрасили клетки с помощью акридина оранжевого. Как и ожидалось, ингибирование P53 приводило к увеличению числа акридин<sup>+</sup> клеток (рис. 3, В). Более того, результаты окрашивания трипановым синим показали, что ингибирование пролиферации клеток PFTa приводило к клеточной смерти (рис. 3, Г). В этом случае, увеличение аутофагии в клетках U87 также сопровождалось арестом клеточного деления и накоплением клеток в G<sub>2</sub>/M фазе клеточного цикла.

## Заключение

Таким образом, впервые показано, что ингибирование клеточного белка P53 увеличивает не только токсичность онколитического аденовируса и темодара, но терапевтический эффект их комбинации. Полученные данные подтверждают существенную роль белка P53 в регуляции клеточного ответа на внешние стимулы и воздействие химиопрепаратов в комбинации с аденовирусом.

УДК 598.26:57.085.23:577.213

А.В. Самойлов<sup>1</sup>, Н.М. Сураева<sup>2</sup>**ТРАНСФЕКЦИЯ *IN VITRO* ЭКЗОГЕННОЙ ДНК КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДА КУР**<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИ технологии консервирования, Московская область, г. Видное<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва**Контактная информация**

Сураева Наталья Михайловна, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)324-60-26

e-mail: nsuraeva@yandex.ru

Статья поступила 14.11.2014, принята к печати 09.02.2015.

**Резюме**

Получение фармакологических белков из белка яйца трансгенной птицы представляет собой довольно сложную и дорогостоящую технологию, в одну из основных задач которой входит создание экспрессирующего вектора. Целью исследований являлось получение и оценка временной экспрессирующей системы на основе первичной культуры трансфицированных экзогенной ДНК эпителиальных клеток куриного яйцевода.

Было изучено три способа выделения клеток яйцевода кур, при этом только при получении клеток методом инкубации фрагмента яйцевода курицы в растворе Трипсина-Версена при 38 °С, при механическом удалении верхнего слоя клеток с его внутренней поверхности удалось получить гомогенную, стабильную первичную культуру, способную к многократным пассажам. Через 2–3 суток монослой пассировали и еще через 1–2 суток уже использовали для трансфекции. Получение культуры не требовало поэтапной или комплексной обработки яйцевода ферментами, дополнительного оборудования и реактивов для удаления стромальных клеток.

Культура клеток яйцевода была успешно трансфицирована с помощью генной конструкции на основе вектора pIRES EGFP2 (фирма Clontech, США) и препарата липосом «Lipofectamin® 2000», при этом число экспрессирующих белок GFP эпителиальных клеток яйцевода составил 5–8 % от общего числа трансфицированных клеток.

С помощью разработанной временной экспрессирующей системы в течение 4–5 суток в условиях *in vitro* было проведено тестирование экспрессии экзогенного гена.

**Ключевые слова:** клетки яйцевода кур, трансфекция, экспрессия экзогенной ДНК.A.V. Samoilov<sup>1</sup>, N.M. Suraeva<sup>2</sup>**TRANSFECTION OF EXOGENOUS DNA IN CHICKEN OVIDUCT CELLS IN VITRO**<sup>1</sup>FSBSI Institute of Canning Technology, Vidnoe, Moscow region<sup>2</sup>FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow**Resume**

Effective production of pharmaceutical proteins using transgenic poultry may be achieved only from a construction of expression vector for chicken oviduct bioreactor. This study was focused on development of temporary expression system by using primary oviduct epithelial cells in which transfected gene expression can be studied.

The present work was aimed to study three manners for preparation of primary oviduct cells, but only one was effective. Selective digestion of chicken oviduct tissue pieces in trypsin at 38° C and mechanical withdrawal of upper cell layer resulted in the isolation of purity primary culture. Experiments indicated that monolayer cultured for 2–3 d were fit to be passaged. Then after 1–2-d, the cells were transfected. Based on our result with primary culture, we did not use complicated enzyme treatment and extra equipment in order to increase the purity of epithelial cells.

Liposomes «Lipofectamine® 2000» were used for primary oviduct cells transfection of a plasmid designed based on the pIRES EGFP2 vector (Clontech, United States). The ratio of cells carrying GFP activity was 5–8% of the total number of cultured cells.

This research was focused on development *in vitro* of temporary expression system in which transfected gene expression can be tested for 4–5 d.

**Key words:** chicken oviduct cells, transfection, expression of exogenous DNA.**Введение**

Технологии получения рекомбинантных белков открывают новые возможности получения белковых фармацевтических препаратов необходимой структуры с низкой себестоимостью производства. Трансгенная птица с тканеспецифичной экспрессией рекомбинантного белка в белке яйца является потенциальным продуцентом для широкомасштабного производства терапевтических препаратов [6]. Яйцевод курицы, используемый в качестве биореактора, способен значительно быстрее и с меньши-

ми затратами, чем, например, молочные железы трансгенных коз или коров, синтезировать так необходимые медицине человеческие белковые препараты. При этом эффективная интеграция и экспрессия чужеродного гена в синтезирующих белок яйца эпителиальных клетках яйцевода возможна только с генной конструкцией, обладающей набором необходимых элементов, что может быть достигнуто за счет подбора регуляторных участков генных векторов экспериментальным путем на большой популяции трансгенных животных [1; 3]. Другой подход к решению этой проблемы может

быть осуществлен за счет создания временной экспрессирующей системы для тестирования экспрессирующего вектора в условиях *in vitro* с использование первичных куриных культур клеток [7; 9]. При этом экономические затраты и время тестирования наиболее оптимальных экспрессирующих генных векторов будут значительно снижены. Однако эффективность такой временной экспрессирующей системы зависит от способа выделения указанной первичной культуры, возможности ее дальнейшего культивирования и трансфекции. Известно несколько методов выделения указанных клеток путем поэтапной или комплексной обработкой тканей яйцевода различными ферментами [7; 11; 12] с целью получения гомогенной популяции эпителиальных клеток. Однако после воздействия ферментов в указанных работах была получена гетерогенная культура клеток, состоящая как из эпителиальных, так из фибробластоподобных и иных клеток, и требовались дальнейшие этапы для получения гомогенной культуры. При этом после удаления фибробластных клеток эпителиальные уже не были способны к дальнейшему росту. Также известно, что эффективность трансфекции первичной культуры зависит от качества полученных клеток и подбора препарата для трансфекции [7].

Цель наших исследований состояла в разработке временной экспрессирующей системы на основе одностадийного метода выделения первичной культуры эпителиальных клеток куриного яйцевода и трансфекции экзогенным геном этих клеток с помощью препарата липосом «Lipofectamin® 2000».

### Материалы и методы

В опытах использовали кур кросса «Хайсекс». Для получения клеток яйцевода куриц в возрасте 10 мес обезглавливали, асептически удаляли участок яйцевода от воронки яйцевода до перешейка и помещали в стерильный раствор PBS («Хеликон» Россия, Москва). Выделенные клетки осаждали центрифугированием при 60 g в течение 2 мин, удаляли надосадочную жидкость, добавляли 1 мл культуральной среды и повторяли промывку.

### Культивирование первичной культуры

Для культивирования клеток яйцевода использовали культуральную среду следующего состава: DMEM («GIBCO», США), 8 % куриной сыворотки, 2 % FBS,  $10^{-7}$  М/л  $\beta$ -эстрадиола (Sigma, США),  $10^{-6}$  М/л кортикостерона (Sigma США), 50 мкг/л инсулина (Sigma, США) и антибиотик. Клетки культивировали при температуре 38 °С, 7% CO<sub>2</sub> в чашках Петри 3,5 см в диаметре с последующим пассированием на культуральные матрасы площадью 25 см<sup>2</sup>.

### Трансфекция чужеродной ДНК клеток яйцевода

Первичную культуру клеток яйцевода трансфецировали с помощью генной конструкции на основе вектора pIRES EGFP2 (фирмы Clontech, США) и препарата для трансфекции «Lipofectamin® 2000» (Invitrogen, США). Данный вектор предназначен для экспрессии в эукариотических клетках, содержит CMV-промотор и эукариотический селективный ген устойчивости к неомицину/канамицину, а также селективный ген зеленого белка (*gfp*). Трансфекцию клеток проводили согласно протоколу использования «Lipofectamin® 2000», конfluence

эпителиальных клеток составляла 80–90 %. Экспрессию гена *gfp* после трансфекции клеток оценивали под микроскопом в ультрафиолетовом свете.

### Результаты и обсуждение

На первом этапе разработки тест-системы генной конструкции необходимо было разработать эффективный и простой в применении метод выделения первичной культуры куриных клеток яйцевода. Для сравнения нами были апробированы три модифицированных способа выделения куриных эпителиальных клеток яйцевода путем применения нашего предыдущего опыта по получению клеток яйцевода коровы и кролика, а также методик выделения различных клеток [4; 8; 10].

1 способ. Отсекали участок яйцевода длиной 7 см, промывали дважды раствором PBS, помещали в среду DMEM («GIBCO», США) и выдавливали эпителиальные клетки из просвета яйцевода в среду давящим поглаживанием от центра к концу тупой стороной скальпеля.

2 способ. Отсекали участок яйцевода длиной 7 см, промывали дважды раствором PBS, зажимали один конец корнцангом, а с другой стороны вливали 5 мл раствора Трипсина-Версена («БиолоТ», Россия) и зажимали второй конец, чтобы предотвратить вытекание раствора. Инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре, удаляли раствор Трипсина-Версена и выдавливали эпителиальные клетки из просвета яйцевода в среду DMEM давящим поглаживанием яйцевода от центра к концу тупой стороной скальпеля.

3 способ. Препарировали участок яйцевода площадью 4 см<sup>2</sup>, промывали раствором PBS трижды, помещали в раствор Трипсина-Версена, инкубировали в течение 1–1,5 ч при температуре 38 °С, промывали раствором PBS, затем тупой стороной скальпеля осторожно снимали верхний слой клеток с внутренней поверхности яйцевода.

При использовании первого и второго способов выделено только небольшое число эпителиальных клеток яйцевода со значительной примесью разрушенных. При последующем культивировании эти клетки не смогли дать рост первичной культуры и погибли, тогда как с помощью третьего способа удалось выделить достаточное число эпителиальных клеток без примеси стромальных клеток, которые при культивировании формировали монослой из клеток с четкими границами, вытянутой формы, без выраженного ядра. Через 2–3 сут монослой достигал 100 % конfluence, и клетки пассировались из чашек в матрасы. Было проведено 5 пассажей, при этом морфологические характеристики клеток не изменились (рис. 1 на 3 пассаже; см. вклейку). Таким образом, разработанный нами способ получения куриной первичной культуры клеток яйцевода с использованием только одного фермента позволил получить гомогенную популяцию эпителиальных клеток, способную дать рост долгосрочной культуре. Этот способ, в отличие от предложенных методов [7; 11; 12] не требует поэтапной или комплексной обработки яйцевода ферментами, дополнительного оборудования и реактивов для удаления стромальных клеток.

С целью тестирования полученных клеток на способность к трансфекции экзогенным геном нами были применены липосомы в качестве переносчиков генной конструкции. В связи с тем, что в наших предыдущих работах по трансфекции куриных клеток, в том числе и при получении трансгенной пти-

цы с использованием опосредованного переноса с помощью сперматозоидов, более эффективным препаратом липосом оказался «Lipofectamin® 2000» [1; 2; 5], нами впервые был применен этот препарат для трансфекции плазмидой pIRES EGFP2 куриных эпителиальных клеток яйцевода.

«Lipofectamin® 2000» также оказался эффективным и на полученной культуре эпителиальных клеток яйцевода, при этом число экспрессирующих белок GFP эпителиальных клеток яйцевода составило 5-8 % от общего числа трансфицированных клеток (рис. 2).

Таким образом, с помощью разработанной нами временной экспрессирующей системы возможно в течение 4–5 суток в условиях *in vitro* про-

вести исследование по тестированию экспрессии экзогенного гена с использованием гомогенной культуры первичных куриных эпителиальных клеток яйцевода.

#### Выводы

Полученные результаты и разработанные подходы по выделению, культивированию и трансфекции *in vitro* чужеродным геном первичной культуры клеток яйцевода курицы позволили разработать временную экспрессирующую систему для эффективного и простого в применении тестирования экспрессирующего вектора в условиях *in vitro*.

#### Литература

1. Самойлов А.В., Сураева Н.М., Барышников А.Ю. и др. Использование сперматозоидов петуха в качестве переносчиков чужеродной ДНК с целью разработки и совершенствования методов получения продуцентов терапевтических белков // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 53–6.
2. Самойлов А.В., Кесян А.З., Сураева Н.М. Получение трансгенных кур с геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека методом опосредованного генного переноса с помощью сперматозоидов // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2013. – № 5. – С. 517–21.
3. Сураева Н.М. Современные подходы к проблеме введения чужеродных генов в половые клетки животных // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 29–37.
4. Сураева Н.М., Толмазова А.Г. Выделение и характеристика первичных половых клеток из гонад 6–9-суточных эмбрионов кур с целью совершенствования метода получения трансгенной птицы // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2004. – № 2. – С. 29–31.
5. Сураева Н.М., Барышников А.Ю., Фисинин В.И., Прокофьев М.И. Изучение эффективности различных способов переноса репортерного гена в эмбриональные клетки кур // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2008. – № 1. – С. 18–23.
6. Сураева Н.М., Самойлов А.В. Получение фармацевтических белков с помощью трансгенной птицы // Вестник РОНЦ им. Блохина Н.Н. РАМН. – 2009. – Т. 20, № 4. – С. 19–25.
7. Фреши Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
8. Gao B., Sun H.C., Song C.Y. et al. Transfection and expression of exogenous gene in laying hens oviduct *in vitro* and *in vivo* // Journal of Zhejiang University Science. – 2005. – 6(2). – P. 137–41.
9. Kim S.H., Choi J.Y., Sohn C.R. et al. Induction of apoptosis in chicken oviduct cells by C2-11. ceramide // Mol. Cells. – 2005. – 19(2). – P. 185–90.
10. Li S., Zhenyu A M., Zhang A. et al. Induction of CXC chemokine messenger-RNA expression in chicken oviduct epithelial cells by salmonella enterica serovar enteritidis via the type three secretion system–1 // AVIAN DISEASES. – 2009. – 53. – P. 396–404.
11. Oishi I., Sungtae S., Yoshii K. et al. cre-loxp-regulated expression of monoclonal antibodies driven by an ovalbumin promoter in primary oviduct cells // bmc biotechnology. – 2011. – 11(5). – p. 1–8.
12. Prokofiev M.I., Ernst L.K., Suraeva N.M. et al. Bovine oocyte maturation, fertilization and further development *in vitro* and after transfer into recipient // Theriogenology. – 1992. – 38. – P. 461–9.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 577.352.2:616-097.3:615.3.014.2

А.А. Матюшин<sup>1</sup>, О.В. Хугаева<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>2</sup>, А.О. Райков<sup>1, 2</sup>, А.Ю. Барышников<sup>1, 2</sup>  
**ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИ-CD5 ИММУНОЛИПОСОМ МИТОКСАНТРОНА *IN VITRO***

<sup>1</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва<sup>2</sup>ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва**Контактная информация**

Матюшин Алексей Аркадьевич, к. фарм. н., доцент кафедры общей химии

адрес: 105043 Москва, 4 Парковая ул., д.31/8; тел. +7(906)705-75-52

e-mail: foralan79@mail.ru

Статья поступила 21.10.2014, принята к печати 09.02.2015.

**Резюме**

Разработана иммунолипосомальная конструкция митоксантрона, направленная против CD5<sup>+</sup> Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Для получения иммунолипосомальной конструкции митоксантрона за основу взяли липосомальную модель, в которой липидное соотношение ФХ : ХОЛ : mPEG<sub>2000</sub>-DSPE : pNP-PEG<sub>3000</sub>-lipid составило 11 : 9 : 0,95 : 0,05. Очистку иммунолипосомальной конструкции митоксантрона от «свободного» митоксантрона и не связавшихся моноклональных антител проводили методом гель-фильтрации. В среднем на одну липосому приходилось ~16 молекул конъюгированных антител. Иммунолипосомы связывались с 88 % антиген<sup>+</sup> клеток. В МТТ-тесте показали, что иммунолипосомы, нагруженные митоксантроном, убивают антиген<sup>+</sup> клетки-мишени.

**Ключевые слова:** иммунолипосомы, моноклональные антитела, митоксантрон, CD5.

А.А. Matyushin<sup>1</sup>, O.V. Khugaeva<sup>1</sup>, M.A. Baryshnikova<sup>2</sup>, A.O. Raykov<sup>1, 2</sup>, A.Yu. Baryshnikov<sup>1, 2</sup>  
**DEVELOPMENT AND STUDY OF MITOXANTRONE ANTI-CD5-IMMUNOLIPOSOME *IN VITRO***

<sup>1</sup>First Moscow State Medical University<sup>2</sup>FSBI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Moscow**Abstract**

Immunoliposomal Mitoxantrone against CD5<sup>+</sup> T-cell lymphoproliferative diseases was developed. Liposomal model with lipid proportion PhCh : Chol : mPEG<sub>2000</sub>-DSPE : pNP-PEG<sub>3000</sub>-lipid 11 : 9 : 0,95 : 0,05 was used for immunoliposome development. We used gel-filtration to remove free Mitoxantrone and unconjugated monoclonal antibody from immunoliposomal construction. One liposome was conjugated with ~16 antibody molecules. Immunoliposomes linked with 80% of antigen<sup>+</sup> cells. Immunoliposomal Mitoxantrone killed antigen<sup>+</sup> target cells in MTT-assay.

**Key words:** immunoliposome, monoclonal antibody, Mitoxantrone, CD5.**Введение**

В последнее десятилетие в онкологических клиниках появился новый класс противоопухолевых препаратов – таргетные препараты [29; 73; 74; 87]. Под понятием «таргетные» подразумеваются препараты, нацеленные на определенную молекулу или рецептор, взаимодействие с которым приводит к гибели клеток. К таким препаратам относятся моноклональные антитела (МКА). Последние похожи на чистейшие химические реагенты, т.к. они специфически связываются только с одной молекулой. Первыми МКА, которые можно назвать таргетными, были МКА АРО-1, анти-Fas, ICO-160, IPO-4 [11; 87; 88; 90–92]. Эти МКА связывались с CD95/Fas рецептором и индуцировали апоптоз. Потом появились таргетные гуманизированные МКА, такие как герцептин, мабтера, авастин и др. [29; 73; 85].

МКА сделали таргетными липосомальные препараты [6]. Если к липосомам присоединить МКА, они доставят загруженный в липосомы препарат непосредственно к молекуле, против которой они направлены [8–10]. Наличие большого разнообразия МКА делает иммунолипосомы уникальным инструментом терапии онкологических заболеваний [6; 17]. В качестве мишеней действия иммунолипосомальных препаратов могут выступать

любые молекулы и рецепторы, локализованные на поверхностной цитоплазматической мембране опухолевой клетки [16; 86]. Предпочтение отдается антигенам, которые при соединении с МКА пинцетируются, доставляя липосомы в цитоплазму клетки [37; 77; 78].

Иммунолипосомы осуществляют направленную доставку препаратов к опухолевой клетке. Однако простые пегилированные липосомы сами по себе способны накапливаться в опухолевой ткани [1; 5; 56; 57; 61]. Это обусловлено феноменом «проницаемости и накопления». Суть его в том, что в неоплазме нарушена васкуляризация, вновь образующиеся кровеносные сосуды в опухолевом узле не успевают за ростом самой опухоли [18; 24; 69; 72; 79]. В эндотелии кровеносных сосудов образуются поры размером до 700 нм. В них проникают липосомы и застревают в опухоли [23]. Они накапливаются в основном в окружающей строме, тогда как иммунолипосомы соединяются непосредственно с опухолевой клеткой. Кроме того, для опухоли характерна васкулогенная мимикрия, при которой кровеносные сосуды образуются из опухолевых клеток [93–96].

Липосомы в клетке попадают в лизосомы, в которых высвобождают противоопухолевое вещество [9; 15; 47]. Хороший терапевтический эффект получается при быстром высвобождении препарата

в опухоли. Существует множество способов повысить выброс препаратов в опухоль. Среди таких новых препаратов наиболее популярны термолипосомы и pH-зависимые липосомы [75; 76].

Преимущество липосомальных препаратов перед другими заключается в том, что они нетоксичны, биodeградируемы и повышают биодоступность [2–4; 12; 22; 33–38; 42; 43; 45; 60]. Липосомы преодолевают лекарственную устойчивость, обусловленную гиперэкспрессией гена MDR1 [84] или отсутствием CD95/Fas-рецептора [13; 14; 19; 20]. Кроме того, в липосомы можно включать водонерастворимые вещества [25; 28; 61]. Этим определяется появление большого количества препаратов для ФДТ [26–28; 34; 49; 50; 62–68; 82; 89]. Липосомальные препараты изменяют фармакокинетику лекарственного вещества и активируют другие механизмы клеточной гибели [21; 39; 44; 54; 55; 81].

Липосомальные препараты уже используются в клинике, однако иммунолипосомальные препараты находятся на стадии доклинического изучения [30–33; 40; 41; 46; 48; 58; 70]. Главным препятствием для разработки иммунолипосомальных препаратов является отсутствие экспериментальной модели [71]. Все мишени действия МКА являются гликопротеидами человеческой природы, и они не реагируют с мышиными аналогами этих антигенов. Использование ксенотрансплантатов человеческих опухолей на голых бестимусных мышках ограничено в связи с тем, что многие антигены утрачиваются на клеточной поверхности при росте опухоли у таких животных. Это является примером одного из способов ухода опухоли от иммунологического надзора [7]. Учитывая изложенное, многие разработки иммунолипосом заканчиваются экспериментами *in vitro* [10; 31; 59; 80].

Новым направлением использования липосом и иммунолипосом является их применение для создания противоопухолевых вакцин [4; 51–53]. Захват липосом дендритными клетками или доставка к иммунокомпетентным клеткам позволят усилить иммунный ответ на опухолевые антигены [83].

Целью настоящей работы стало создание иммунолипосом, нагруженных митоксантроном, которые специфически связываются с клетками, экспрессирующими T-клеточный антиген CD5.

## Материалы и методы

### Метод получения иммунолипосом

В работе использовали МКА ISO-80, созданные в ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина». Для приготовления липосом использовали метод обращения фаз. Точные навески яичного фосфатидилхолина, холестерина, DSPE-PEG<sub>2000</sub> и rNp-PEG<sub>3000</sub>-lipid растворяли в 7 мл хлороформа. Смесь перенесли в круглодонную колбу и упаривали органический растворитель на ротационном испарителе под вакуумом при температуре не выше 37±2 °C до образования липидной пленки. Пленку сушили под вакуумом в течение 40–50 мин. Далее ее гидратировали 1,5 мл 125 мМ раствора сульфата аммония при постоянном перемешивании до полного исчезновения пленки со стенок колбы. Для получения малых однослойных липосом использовали экструзионный метод, который основывается на последовательном продавливании дисперсии липосом через мембранные фильтры «Nuclepore» Ø пор 400; 200 и 100 нм с применением ручного мини-экструдера. Присоединение антител к липосомам и включение препарата осуществляли по принципу

активной загрузки с помощью ионного градиента сульфата аммония, pH 5,5 [81]. Для этого 0,4 мл полученных пустых липосом помещали во флакон вместимостью 10 мл и добавляли МКА ISO-80, исходя из мольного соотношения белок/rNp-PEG<sub>3000</sub>-lipid 1 : 40. Смесь перемешивали и добавляли 2,6 мл буфера, содержащего 10 мМ HEPES и 145 мМ NaCl (pH 8,2–8,4) и 3 мл раствора митоксантрона (концентрация 2 мг/мл). Конечный объем дисперсии составил 6 мл. Далее доводили pH в дисперсии 3 М раствором NaOH до значения 8,5–8,6 и инкубировали в течение 12 ч при +4 °C и постоянном перемешивании. Весовое соотношение препарат : липиды составило 0,12 : 1.

### Измерение диаметра везикул

Анализ среднего диаметра полученных везикул и оценку их распределения по размерам проводили с использованием метода корреляционной спектроскопии светорассеяния с помощью прибора Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.

### Получение чистой фракции иммунолипосом

Очистку дисперсии от не включившегося в везикулы препарата и не присоединившихся МКА проводили методом гель-фильтрации. На хроматографическую колонку C10/20, заполненную сефадексом G-50 и предварительно уравновешенную 0,15М р-ром хлорида натрия в течение 1 ч (при скорости 0,3–0,4 мл/мин), наносили 1 мл иммунолипосомальной дисперсии с митоксантроном. В качестве элюента использовали 0,15М раствор хлорида натрия, скорость элюции составляла 0,5мл/мин и регулировалась перистальтическим насосом Liposomat. Процесс очистки контролировали с помощью детектора UVis-920 с длиной волны 215 нм и рекордера REC 111, фиксировавшего разделение в виде пиков.

### Количественное определение инкапсулированного митоксантрона

Для определения митоксантрона в липосомальной или иммунолипосомальной дисперсиях применяли стандартную спектрофотометрическую методику количественного определения вещества с использованием РСО митоксантрона при длине волны 242±2нм. Исследование влияния вспомогательных веществ на спектральные характеристики митоксантрона показало, что присутствие фосфатидилхолина, холестерина, PEG<sub>2000</sub>DSPE, rNp-PEG<sub>3000</sub>-lipid и криопротекторов (сахарозы, глюкозы) не изменяет положения характеристического максимума. Измерение оптической плотности спиртовых растворов проводили относительно 95% этилового спирта в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм.

Содержание митоксантрона (X, мг) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \times a \times C}{D_0 \times C_0}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность раствора образца;  
D<sub>0</sub> – оптическая плотность РСО митоксантрона;  
C – величина разбавления образца;  
C<sub>0</sub> – величина разбавления РСО митоксантрона,  
a – навеска РСО митоксантрона, мг.

Эффективность включения митоксантрона в липосомы (В, %) рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{D_1 \times C_1 \times V_1}{D \times C \times V} \times 100\%, \text{ где}$$

$D_1$  – оптическая плотность раствора фракции с очищенным липосомальным митоксантроном;  
 $D$  – оптическая плотность раствора исходной липосомальной дисперсии;  
 $C_1$  – величина разбавления фракции с очищенным липосомальным митоксантроном;  
 $C$  – величина разбавления исходной липосомальной дисперсии;  
 $V_1$  – объем фракции с очищенным липосомальным митоксантроном, мл;  
 $V$  – объем исходной липосомальной дисперсии, нанесенной на колонку, мл. Митоксантрон, холестерин и фосфатидилхолин в составе липосомального препарата определяли хроматографически.

### Непрямая РИФ

Специфическое связывание иммунолипосом с клетками определяли в непрямой реакции поверхностной иммунофлуоресценции.

Для проведения реакции  $5 \times 10^4$  дважды отмытых в PBS клеток инкубировали с 20 мкл меченых МКА, иммунолипосомальным митоксантроном, а также пустыми иммунолипосомами, в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего клетки отмывали PBS центрифугированием в течение 7 мин при 1200 об/мин.

Затем клетки инкубировали в течение 30 мин при  $+4^\circ\text{C}$  с 10 мкл F(ab)<sub>2</sub>фрагментов кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши (рабочее разведение 1 : 200), меченных FITC.

После чего клетки дважды отмывали PBS и ресуспендировали в PBS, содержащем 1%-ный формалин и 0,1%-ный азид натрия. Результаты реакции анализировали на проточном цитофлуориметре FACScan.

### Оценка

#### цитотоксической активности

#### ЛФ митоксантрона МТТ-тестом

Для оценки способности иммунолипосом, нагруженных митоксантроном, избирательно доставлять лекарственный препарат к клеткам-мишеням, исследуемые образцы инкубировали с клетками в течение 1 часа при  $+4^\circ\text{C}$ .

После этого клетки отмывали и оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при  $+37^\circ\text{C}$  и 5% CO<sub>2</sub>.

Контролем служили интактные клетки, которые инкубировали в тех же условиях. Общее время инкубации составило 24; 48 и 72 ч. За 6 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили раствор МТТ (концентрация 5 мг/мл).

По окончании инкубации планшеты центрифугировали при угловой скорости 1500 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость удаляли.

Осадок растворяли в 150 мкл ДМСО и помещали планшеты на 5–7 минут в термостат при температуре  $+37^\circ\text{C}$ .

Далее, планшеты встряхивали на шейкере, после чего интенсивность окрашивания измеряли на спектрофотометре «Titertek Multiscan MCC/340» при  $\lambda=530$  нм.

Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Процент живых клеток вычисляли по формуле:

$$N_0 = \frac{[N_1 - n] \times 100\%}{N_2}, \text{ где}$$

$N_0$  – процент живых клеток;

$N_1$  – средняя оптическая плотность лунок, содержащих клетки и препарат;

$N_2$  – средняя оптическая плотность контрольных лунок, содержащих только клетки;

$n$  – оптическая плотность лунок, содержащих только митоксантрон.

Для каждого препарата строили график зависимости «доза – эффект» и определяли ИК<sub>50</sub>.

**Статистический анализ** проводили с использованием программ «BIOSTAT» (Version 3.2), Microsoft Excel, Statisticav.5.0. Различия считали статистически достоверными при  $p \leq 0,02$  и  $p \leq 0,05$ , использовали t-критерий Стьюдента, односторонний и двусторонний точный критерий Фишера.

### Результаты и обсуждение

#### Получение

#### иммунолипосомальной конструкции митоксантрона

ИЛМ получали согласно методу обращения фаз, описанному ранее [48]. Для получения иммунолипосомальной конструкции митоксантрона за основу взяли липосомальную модель, в которой липидное соотношение ФХ : ХОЛ : mPEG<sub>2000</sub>-DSPE : рNP-PEG<sub>3000</sub>-lipid составило 11 : 9 : 0,95 : 0,05. Липидный состав иммунолипосом представлен в табл. 1.

Очистку ИЛМ от «свободного» митоксантрона и не связавшихся МКА ICO-80 проводили методом гелевой фильтрации. Контроль разделения фракций осуществляли с помощью проточного спектрофотометра UVIS-920. На выходе регистрировали четкое разделение на три пика, соответствующие чистой фракции ИЛМ (I), не связавшимся МКА (II) и буфера HEPES с NaCl (III; рис. 1). Сошедшие фракции собирали в стерильные флаконы и подвергали спектрофотометрическому анализу.

Условия хроматографии: колонка: С 10/20 (Amersham Biosciences); элюент: 0,15M NaCl; скорость элюции 0,5 мл/мин; детектор: UVIS-920 при 215 нм (Amersham Biosciences); температура колонки – комнатная. Скорость движения бумаги в рекордере – 2 мм/мин.

#### Спектрофотометрическое

#### определение содержания митоксантрона в иммунолипосомальной конструкции

Первоначально определяли максимумы поглощения спиртовых растворов субстанции СМ и препарата в исследуемых образцах с целью выбора рабочей длины волны. В случае ИЛМ исследовали также влияние МКА на спектрофотометрическое определение препарата в везикулах. В качестве растворителя использовали 95 %-ный этиловый спирт. Оптическую плотность спиртовых растворов СМ, ICO-80-ИЛМ, ЛМ измеряли в диапазоне длин волн от 200 нм до 700 нм в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм (относительно 95 %-ного этилового спирта). Полученный спектр поглощения спиртового раствора СМ, представлен на рис. 2.

На полученной спектрограмме наблюдается четыре максимума при 242 нм, 280 нм, 620 нм и 673 нм. Спектры поглощения спиртовых растворов ЛМ и ИЛМ по положению максимумов и форме кривой были идентичны спектру спиртового раствора СМ (рис. 3 и 4).

Таблица 1

Липидный состав анти-CD5 иммунолипосомального митоксантрона

Состав	Молярное соотношение	Молекулярный вес, г/моль	Концентрация, мг/мл	% мол.
Фосфатидилхолин	11	760,09	57	52,38
Холестерин	9	386,70	23,7	42,86
mPEG <sub>2000</sub> -DSPE	0,95	2805,05	18,2	4,52
pNP-PEG <sub>3000</sub> -lipid	0,05	3400	1,1	0,24
			$\Sigma = 16,65$	

Таблица 2

Влияние липосомальной формы, иммунолипосомальной конструкции и субстанции митоксантрона на жизнеспособность клеток линии Jurkat

ЛФ	Концентрация митоксантрона, мг/мл					
	0,1	0,025	0,006	0,00156	0,00039	0,000097
	Количество живых клеток, %					
СМ	20±3	22±1	22±3	23±2	34±5	51±4
ЛМ	48±2*,***	49±4*,***	53±4*	79±5*	86±8*	98±3*
ICO-80-ИЛМ	35±2**,***	36±1**,***	50±7**	73±8**	86±14**	87±12**

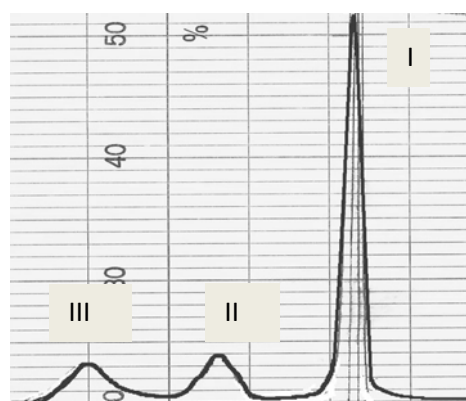
\* $p \leq 0,02$  по отношению к СМ; \*\* $p \leq 0,02$  для ИЛМ по отношению к СМ; \*\*\* $p \leq 0,02$  для ЛМ по отношению к ИЛМ

Рис. 1. Хроматограмма очистки ICO-80-ИЛМ от не связанных МКА и препарата:

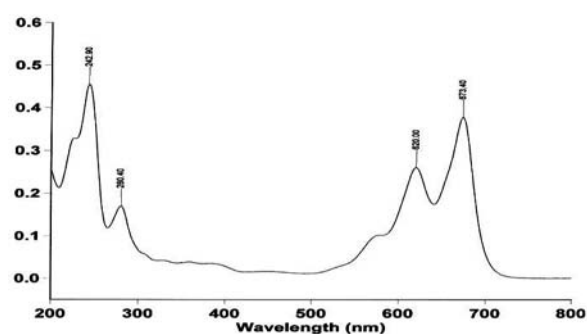
I – фракция очищенных ИЛМ; II – МКА ICO-80;  
III – буфер HEPES с NaCl.

Рис. 2. Спектрограмма спиртового раствора СМ.

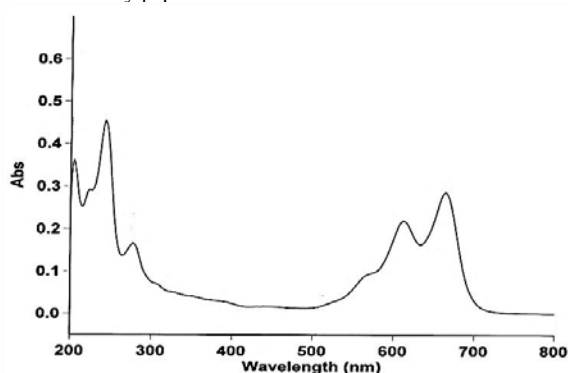


Рис. 3. Спектрограмма спиртового раствора ЛМ.

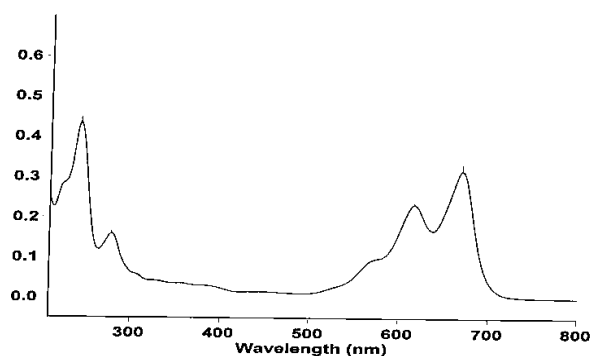


Рис. 4. Спектрограмма спиртового раствора ICO-80-ИЛМ.

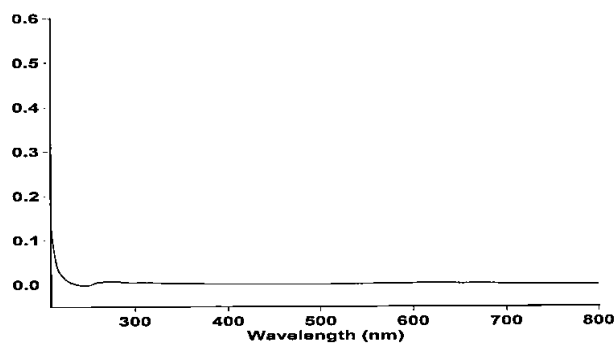


Рис. 5. Спектрограмма спиртового раствора пустых липосом.

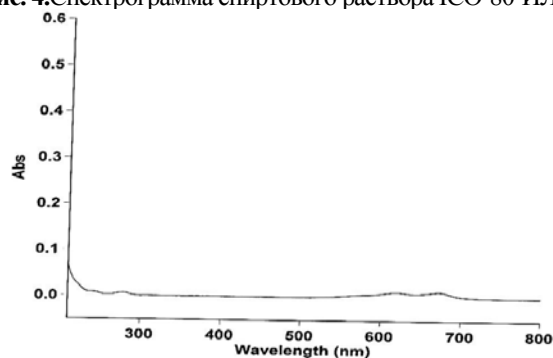
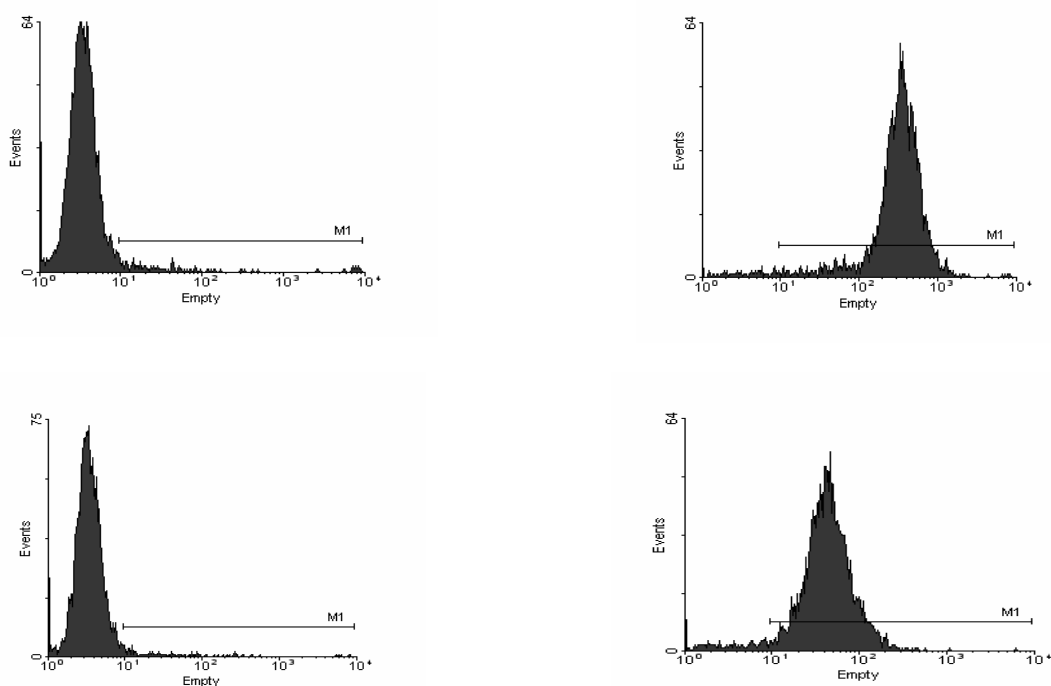
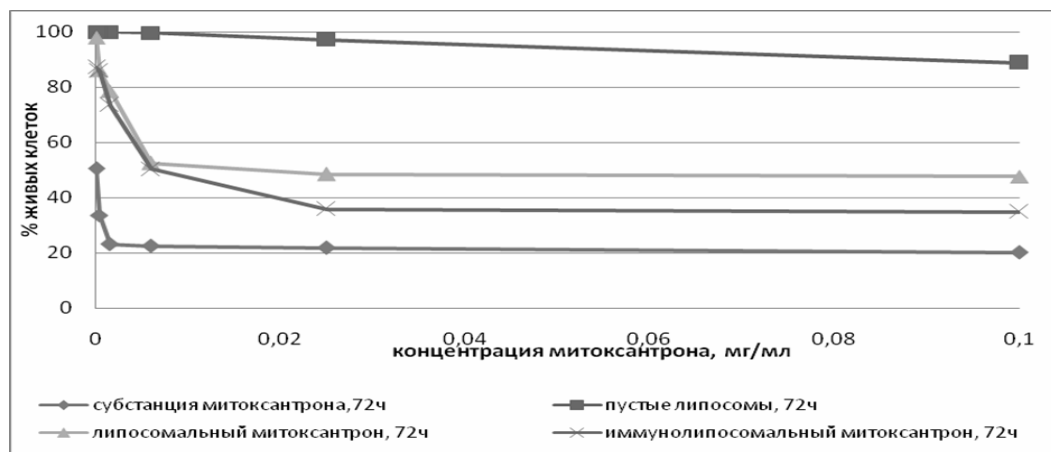


Рис. 6. Спектрограмма спиртового раствора ICO-80.

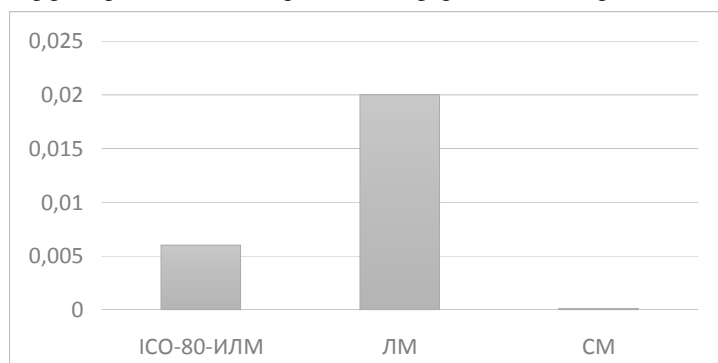


**Рис. 7.** Анализ специфического связывания ICSO-80-ИЛМ с клетками линии Jurkat методом проточной цитофлуориметрии:

- А – неокрашенные клетки;
- Б – клетки, инкубированные с МКА ICSO-80;
- В – клетки, инкубированные с ЛМ;
- Г – клетки, инкубированные с ИМЛ и F(ab)<sub>2</sub>, меченными FITC.



**Рис. 8.** Цитотоксический эффект различных лекарственных форм митоксантрона в отношении клеток Jurkat.



**Рис. 9.** Сравнение значений ИК<sub>50</sub> субстанции митоксантрона, липосомального и иммунолипосомального митоксантрона на клеточной линии Jurkat

В качестве аналитической выбрали длину волны, на которой пик митоксантрона был наиболее выраженным и узким.

Такой пик отмечали при длине волны 242 нм. Для исследования потенциального влияния МКА ICO-80, используемых в качестве векторов, и компонентов липосом на спектральные характеристики митоксантрона, прописывали максимумы поглощения спиртовых растворов ICO-80, а также пустых липосом в диапазоне длин волн от 200 нм до 700 нм.

Пустые липосомы получали из фосфатидилхолина, холестерина, mPEG<sub>2000</sub>-DSPЕ и pNP-PEG<sub>3000</sub>-lipid в молярном соотношении 11 : 9 : 0,95 : 0,05. Затем их разбавляли в 20 раз буфером из 10мМ HEPES и 145мМ NaCl (pH 8,4).

Оптическую плотность спиртовых растворов МКА и липосом измеряли в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм относительно спирта.

Полученные спектрограммы представлены на рис. 5 и 6. Степень включения митоксантрона в иммунолипосомы составила 95±5 %.

#### **Определение количества МКА ICO-80, связанных с поверхностью липосом**

Среднее количество белка во всей очищенной фракции пустых ICO-80-ИЛМ составило 0,107 мг. Из литературных данных известно, что одну липосому ø100 нм составляют 100 000 молекул липидов [48; 70], то на липосому ø 150 нм приходится 150 000 молекул липидов.

Если учесть, что средняя молекулярная масса липидов составляет 760 Да, а молекулярная масса иммуноглобулинов IgG<sub>3</sub> – 170 000 Да, то, зная соотношение фосфолипидов и белка в полученном препарате, можно вычислить, сколько молекул антител приходилось на одну липосому:

$$N = \frac{m \times N_A}{M}, \text{ где}$$

N – число молекул,

m – масса вещества, взятого согласно методике приготовления ИЛМ,

M – молекулярная масса вещества.

Таким образом, в среднем на одну ICO-80-ИЛМ приходилось ~ 16 молекул конъюгированных антител.

#### **Оценка специфического связывания иммунолипосом с клетками-мишенями**

При создании анти-CD5-ИМЛ использовали МКА ICO-80 против T-клеточного антигена CD5 [6]. Эти МКА специфически реагировали с CD5-положительными клеточными линиями, T-лимфоцитами периферической крови здоровых доноров и T-клеточными лейкозами и лимфомами.

Для оценки способности иммунолипосом избирательно связываться с клетками-мишенями была использована T-клеточная линия *Jurkat*. Оценка специфического связывания проводили с помощью непрямой РИФ.

В популяции клеток линии *Jurkat* выявлено 98 % CD5<sup>+</sup> клеток-мишеней (рис. 7). При инкубации с липосомальной формой митоксантрона специфическое связывание не отмечали.

После инкубации клеток с иммунолипосомальной конструкцией митоксантрона регистрировали связывание с 88 % клеток (рис. 7).

#### **Оценка цитотоксической активности иммунолипосомальной конструкции митоксантрона in vitro**

Оценку цитотоксического действия полученных иммунолипосом проводили в МТТ-тесте. В исследовании использовали очищенную ИЛМ, ЛМ, СМ, а также пустые иммунолипосомы.

Разведения пустых иммунолипосом готовили исходя из концентрации липидов в ИЛМ.

Перед проведением теста все образцы подвергали стерилизующей фильтрации через мембранные фильтры с низкой сорбцией белка.

Каждый препарат исследовали в 6 концентрациях, каждое разведение ставили в триplete. В контрольные лунки с клетками добавляли по 20 мкл чистой среды RPMI-1640.

По результатам теста строили кривые выживаемости клеток и определяли концентрацию, при которой происходит гибель 50 % клеток (ИК<sub>50</sub>).

В таблицу 2 представлена зависимость количества живых клеток от концентрации митоксантрона в культуре клеток *Jurkat* после 72-часового инкубирования.

Субстанция митоксантрона и обе липосомальные лекарственные формы оказывали дозозависимый эффект.

Однако липосомальные препараты убивали меньшее количество клеток по сравнению с субстанцией.

На рис. 8 представлены результаты 72 часов инкубации ICO-80-ИЛМ, ЛМ, СМ и пустых липосом с клетками линии *Jurkat*.

Нижняя кривая, которая соответствовала группе клеток, инкубированных с субстанцией митоксантрона, показала самый низкий процент выживших клеток.

Верхняя кривая соответствует пустым липосомам, которые в исследованном диапазоне концентраций не проявляют цитотоксический эффект. ICO-80-ИЛМ проявила более высокий цитотоксический эффект, чем ЛМ, в концентрациях 0,025мг/мл и 0,1мг/мл он составил 36 и 35 %, а для ЛМ – 49 и 48 % соответственно.

Средняя величина ИК<sub>50</sub> в группе клеток, инкубированных с ICO-80-ИЛМ, составила 0,006±0,002 мг/мл, с ЛМ – 0,02±0,004 мг/мл и с СМ – 9×10<sup>-5</sup>±0,2×10<sup>-5</sup> мг/мл (рис. 9).

Были выявлены достоверные различия значений ИК<sub>50</sub> в группах ICO-80-ИЛМ, ЛМ и СМ (p<0,05).

Таким образом, иммунолипосомы более эффективны по сравнению с липосомальным митоксантроном.

#### **Заключение**

Разработана иммунолипосомальная конструкция митоксантрона, направленная против CD5<sup>+</sup> T-клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Соотношение липидов в данной конструкции составило ФХ : ХОЛ : mPEG<sub>2000</sub>-DSPЕ : pNP-PEG<sub>3000</sub>-lipid составило 11 : 9 : 0,95 : 0,05.

На одну липосому в среднем приходилось 16 молекул антител ICO-80.

Имунолипосомы связывались с антиген-положительными клетками, и в МТТ тесте было показано, что иммунолипосомальный митоксантрон обладал большей цитотоксичностью по сравнению с липосомальной формой.

## Литература

1. Алексеева А.С., Апкаева М.Р., Щегловитова О.Н. и др. Специфическое связывание и накопление в эндотелиальных клетках цитотоксических липосом с лигандом селективных сиалил-Льюис-X // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 58.
2. Альбассит Б., Зангиева М.Т., Барышникова М.А. и др. Липосомальный противоопухолевый препарат ОР-2011 из класса нитрозомочевин для лечения меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 59.
3. Альбассит Б., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка липосомальной лекарственной формы нового соединения из класса нитрозоалкилмочевин // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т.12, №2. – С. 5.
4. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
5. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. и др. Синтез и изучение цитотоксической активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 47–53.
6. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – № 8. – С. 4.
7. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
8. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–30.
9. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
10. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // Современная онкология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 4.
11. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 58.
12. Барышникова М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозомочевин // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 8.
13. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бурова О.С. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
14. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Полозкова А.П. Влияние лекарственных форм аранозы на индукцию апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 64.
15. Барышникова М.А., Зангиева М., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
16. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
17. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
18. Григорьева И.Н., Харатешвили Т.К., Барышников А.Ю. Васкулогенная мимикрия: альтернативный механизм кровоснабжения опухоли? // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
19. Грищенко Н.В., Барышникова М.А., Полозкова А.П. и др. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
20. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А., и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевин // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 49–54.
21. Гулякин И.Д., Санарова Е.В., Ланцова А.В. и др. Разработка наноструктурированной модели лекарственной формы производного индолкарбазола – ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 78.
22. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Применение фармацевтической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 101–8.
23. 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.
24. Дедов И.И., Шестакова М.В., Кочемасова Т.В. и др. Дисфункция эндотелия в развитии сосудистых осложнений сахарного диабета (проблемная статья) // Российский физиологический журнал. им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 8. – С. 1073–84.
25. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
26. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Орлова О.Л. и др. Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.



27. Дмитриева М.В., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Качественный анализ липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 81.
28. Дрожжина В.В., Осипчук Ю.С. Сравнительный анализ противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов борнинового хлорина и «борхлорина липосомального лиофилизата» после фотодинамической терапии саркома М-1 крыс // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 45–50.
29. Зейналова К.Р., Вишневецкая Я.В., Ганьшина И.П. Транстузумаб в комбинации с доцетакселом и карбоплатином в неoadъювантной терапии местнораспространенного рака молочной железы (клинико-морфологическое исследование) // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 103–6.
30. Зангиева М.Т., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка состава пространственно стабилизированных иммунолипосом, направленных против Her-2 рецептора // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 85.
31. Зангиева М.Т., Игнатъева Е.В., Косоруков В.С. Оценка эффективности включения доксорубина в иммунолипосомы, направленные против Her-2 рецептора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 31.
32. Зангиева М.Т., Игнатъева Е.В., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Разработка оптимального состава пространственно стабилизированных липосом, нагруженных доксорубицином // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 18.
33. Зангиева М.Т., Матюшин А.А., Соколова Д.В. и др. Разработка и исследование иммунолипосомальных конструкций in vitro // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 19–28.
34. Истомин Ю.К., Артемьева Т.П., Александров Е.Н., Церковский Д.А. Сонодинамическая и сонофотодинамическая терапия злокачественных опухолей с использованием фотосенсибилизаторов // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 119–28.
35. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
36. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
37. Кортова М.А., Палкина Т.Н., Толчева Е.В. и др. Подходы к созданию иммунолипосом на примере доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 6.
38. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П. и др. Доклиническое изучение общетоксического действия лиофилизированной липосомальной формы тиосенса (ЛЛЛФТ) // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 43.
39. Котова Е.А., Смирнова З.С., Краснюк И.И. и др. Противоопухолевое действие липосомальной формы цифелина на лейкоз Р-388 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 46.
40. Краснополянский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шаболов Д.Л., Швец В.И. Липосомальные лекарственные препараты в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 48.
41. Краснополянский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И., Щахмаев А.Е. Липосомальные препараты для вспомогательной терапии в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 29.
42. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Дмитриева М.В., Оборотова Н.А. Изучение «острой» токсичности липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 51–6.
43. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Изучение «хронической» токсичности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса на крысах // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 30.
44. Ланцова А.В., Барышникова М.А., Санарова Е.В. и др. Изучение в системе in vitro наноструктурированной лекарственной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 31.
45. Ланцова А.В., Сапрыкина Н.С., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Противоопухолевая активность наноструктурированной формы лизомустина на мышцах с солидной опухолью меланомы В-16 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 52.
46. Левачева И.С., Барышникова М.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов липосомами // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 32.
47. Матюшин А.А., Барышникова М.А., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Липосомы: организм, опухоль, клетка // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 6. – С. 3–10.
48. Матюшин А.А., Хугева О.В., Барышникова М.А. и др. Получение и изучение анти-CD20 иммунолипосомального митоксантрона in vitro // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 15–24.
49. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
50. Меерович И.Г. Мицеллярный фотосенсибилизатор на основе 4,5-октакис(децилио)-3,6-октахлорофталацианина цинка Октосенс // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 41–44.
51. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
52. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Багирова Н.С. и др. Стерилизация многослойных протеолипосом // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 9–12.

53. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение экспрессии hsp70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–8.
54. Моисеева Е.В., Кузнецова Н.Р., Аронов Д.А. и др. Противоопухолевое действие липосом с липофильным пролекарством комбретастатина А4 на модели острого Т-клеточного лейкоза мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 3–10.
55. Моисеева Е.В., Кузнецова Н.Р., Ситников Н.С. и др. Противоопухолевый эффект наноразмерных липосом с липофильным пролекарством комбретастатина А4 на мышинной модели острого Т-лейкоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 36.
56. Оборотова Н.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – Т. 36, № 10. – С. 47.
57. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
58. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
59. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – № 2. – С. 27–31.
60. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3-4. – С. 33–40.
61. Оборотова Н.А., Смирнова З.С., Полозкова А.П., Барышников А.Ю. Фармацевтические аспекты разработки липосомальных лекарственных форм для внутривенного введения гидрофобных цитостатиков // Вестник РАМН. – 2002. – № 1. – С. 42–5.
62. Осипчук Ю.С., Дрожжина В.С. Фотодинамическая терапия саркомы М-1 крыс с использованием нового фотосенсибилизатора борхлорин липосомальный лиофилизат // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 47–50.
63. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Применение липосомальных систем доставки для создания нового эффективного противоопухолевого фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 72.
64. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Дмитриева М.В. и др. Фотодинамическая терапия – способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 109–18.
65. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Макарова О.А. и др. Доклиническое изучение липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 40–45.
66. Смирнова З.С., Меерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
67. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфатфалоцианина // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
68. Смирнова З.С., Санарова Е.В., Борисова Л.М. и др. Противоопухолевая активность фотодинамической терапии с липосомальной лекарственной формой тиосенса на перевиваемых опухолях мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, №4. – С. 56–60.
69. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.В. и др. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 3–10.
70. Соколова Д.В., Тазина Е.В., Кортава М.А. и др. Анти-MUC-1 иммунолипосомальная конструкция доксорубина для направленной доставки в опухоль // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 99–103.
71. Соколова Д.В., Трещалина Е.М., Андропова Н.В. и др. Модели для доклинического изучения in vivo противоопухолевой активности таргетных препаратов против антигена MUC-1 // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 55–60.
72. Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Личиницер М.Р. Перспективы использования ингибиторов NFKB в клинической практике // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 27–30.
73. Степанова Е.В., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р. Оценка ангиогенеза опухолей человека // Успехи современной биологии. – Т. 120, № 6. – С. 599.
74. Степанова Е.В., Зейналова К.Р. Механизм резистентности к транструзумабу // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 3–8.
75. Тазина Е.В., Оборотова Н.А. Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 4–12.
76. Тазина Е.В., Мецрякова В.В., Игнатьева Е.В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 40–7.
77. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
78. Толчева Е.В., Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. и др. Анти-CD5-иммунолипосомы как транспортная система для направленной доставки лекарственных препаратов к CD5+клеткам // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 4.- С. 38–43.
79. Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Верескунова М.И. Состояние некоторых маркеров ангиогенеза и пролиферации в ткани опухолей репродуктивной системы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 58.

80. Хугаева О.В., Кортава М.А., Зангиева М.Т. и др. Химико-фармацевтические исследования липосомальной формы митоксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 41–6.
81. Хугаева О.В., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм митоксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 51–4.
82. Чан Тху Хай Иен, Поздеев В.И., Меерович Г.А. и др. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 105–7.
83. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. и др. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 55–61.
84. Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный pgp170 // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 20–3.
85. Якушева Т.А., Когония Л.М., Федотов А.И. и др. Авастин в лечении метастатического колоректального рака // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 35–9.
86. Baryshnikov A.Yu., Baryshnikova M.A. Immunoliposomes and their targets // Russian J. General Chemistry. – 2013. – 83(12). – P. 2565–70.
87. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R. Tupitsin N.N. et al. CD95 (Fas/APO-1) antigen is a new prognostic marker of blast cells of acute lymphoblastic leukaemia patients / Book Editor(s): Kaspers, GJL; Pieters, R; Veerman, AJP. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III Book Series: Advances in Experimental Medicine and Biology. 1999. – Vol.: 457. – P. 251–8.
88. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Zabolina T.N. et al. FAS(APO-1/CD95) antigen: new activation marker for evaluation of the immune status // Russian Immunological J. – 1997. – 2(2). – P. 115.
89. Derkacheva V.M., Meerovich G.A., Meerovich I.G. et al. Heterooxyaluminium tetra-3-phenyl thiophthalocyanin is a new effective photosensitizer for photodynamic therapy and fluorescent diagnosis // Bulletin Experimental Biology and Medicine. – 2005. – 139(4). – P. 422–30.
90. Polosukhina E.R., Zabolina T.N., Shishkin Yu.V. et al. Studing of Fas(APO-1/CD95) antigen expression by flow cytometry with monoclonal antibodies IPO-4 // Experimental Oncology. – 1997. – 19(3). – P. 206–11.
91. Polosukhina E.R., Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. et al. Expression of antigen CD95(Fas/APO-1) mediating apoptosis in hemoblastosis using monoclonal antibodies ICO-160 // Hematology and transfusiology. – 2000. – 45(4). – P. 3–6.
92. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. Comparative analysis of apoptosis induced by various anticancer drugs in Jurkat cells // Experimental Oncology. – 2000. 23(1). – P. 46–50.
93. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // Melanoma Research. – 2007. – 17(1). – P. 1–8.
94. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level // Melanoma Research. – 2007. – 17(6). – P. 370–9.
95. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Gutorov S.V. et al. Prognostic significance of periodic acid-schiff-positive patterns in clear cell renal carcinoma // The Canadian Journal of Urology. – 2009. – 16(4). – P. 4726–32.
96. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Grigorjeva I. et al. VEGFR1 and PKCa signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VGFR2 kinasa-idependent manner // Melanoma Research. – 2011. – 21(2). – P. 91–8.

УДК 615.832.3:616-006-018-092.4

Р.И. Якубовская<sup>1</sup>, А.Д. Плютинская<sup>1</sup>, Е.А. Плотникова<sup>1</sup>, М.А. Грин<sup>2</sup>, А.Ф. Миронов<sup>2</sup>  
**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ  
В СИСТЕМЕ IN VITRO. ПИРОФЕОФОРБИДЫ И ХЛОРИНЫ**

<sup>1</sup>Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – Филиал ФГБУ «Федерального медицинского исследовательского центра им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, Москва

<sup>2</sup>«Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова», Москва

**Контактная информация**

Плютинская Анна Дмитриевна, к.б.н, научный сотрудник отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии МНИОИ им. П.А. Герцена – Филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» МЗ РФ

адрес: 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, д.3, тел. +7(495)945-87-16

e-mail: [anna2031@rambler.ru](mailto:anna2031@rambler.ru)

Статья поступила 10.11.2014, принята к печати 09.02.2015.

**Резюме**

В работе оценены физико-химические и биологические свойства гликозилированных производных пиррофторбида *a* и хлорина *e*<sub>6</sub>, циклоимидных производных хлорина *p*<sub>6</sub>.

Гликозилированные производные пиррофторбида *a* и хлорина *e*<sub>6</sub> характеризовались стабильностью в растворах без воздействия светом, но при облучении подвергались фотовыцветанию.

В биологических тестах производные пиррофторбида *a* проявляли высокую фотоиндуцированную активность, величина ИК<sub>50</sub> варьировалась от 35±7нМ до 82±7 нМ (в зависимости от бокового заместителя и культуры опухолевых клеток). Среди производных хлорина *e*<sub>6</sub> наибольшую активность проявил конъюгат с галактозным остатком в пирроле А в отношении клеток культуры НЕР2, А549 и НТ29 (ИК<sub>50</sub> – 15±8 нМ, 70±19 нМ и 34±16 нМ, соответственно), активность которого превышала в 8-10 раз неконъюгированный аналог и производные с другой модификацией в макроцикле.

Циклоимидные производные хлорина *p*<sub>6</sub> стабильны в растворе без облучения и относительно устойчивы при воздействии светом. В биологических тестах эти соединения проявляли высокую фотоиндуцированную активность (ИК<sub>50</sub> варьировала от 35±10нМ до 250±30 нМ), которая в значительной степени превышала активность немодифицированных производных хлорина *p*<sub>6</sub>.

**Ключевые слова:** фотодинамическое воздействие *in vitro*, производные пиррофторбида *a*, производные хлорина *e*<sub>6</sub> и хлорина *p*<sub>6</sub>, опухолевые клетки.

R.I. Yakubovskaya<sup>1</sup>, A.D. Plyutinskaya<sup>1</sup>, E.A. Plotnikova<sup>1</sup>, M.A. Grin<sup>2</sup>, A.F. Mironov<sup>2</sup>

**COMPARATIVE IN VITRO STUDY OF DIFFERENT CLASSES OF PHOTSENSITIZERS. PYROPHEOPHORBIDES AND CHLORINES**

<sup>1</sup>P.A. Hertsen Moscow Research Institute of Oncology, Moscow

<sup>2</sup>Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow

**Abstract**

The study evaluates physical, chemical and biological properties of glycosylated derivatives of pyropheophorbide-*a* and chlorine *e*<sub>6</sub>, cycloimid derivatives of chlorine *p*<sub>6</sub>.

Glycosylated derivatives of pyropheophorbide *a* and chlorine *e*<sub>6</sub> were characterized by stability in solution without light exposure, but subject to photobleaching during exposure.

Derivatives of pyropheophorbide-*a* showed high photo-induced activity in biological assay, the IC<sub>50</sub> value varied from 35±7nM to 82±7 nM (depending on the pendent group and the tumor cell culture). Among the derivatives of chlorine *e*<sub>6</sub> conjugate with galactose residue in A-pyrrole showed the maximum activity towards НЕР2, А549 and НТ29 cells (IC<sub>50</sub> – 15±8 nM, 70±19 nM and 34±16 nM respectively), its activity 8-10 times exceeding the unconjugated counterpart and the derivatives with different macrocycle modification.

Cycloimid derivatives of chlorine *p*<sub>6</sub> are stable in solution without exposure and relatively stable under light exposure. These compounds showed high photo-induced activity in biological assay (IC<sub>50</sub> varied from 35±10 nM to 250±30 nM) significantly exceeding the activity of unmodified derivatives of chlorine *p*<sub>6</sub>.

**Key words:** photodynamic effect *invitro*, derivatives of pyropheophorbide-*a*, derivatives of chlorine *e*<sub>6</sub> and chlorine *p*<sub>6</sub>, tumor cells.

**Введение**

Фотодинамическая терапия – способ лечения злокачественных новообразований, основанный на применении трех малотоксичных компонентов, а именно фотосенсибилизатора, кислорода и лазерного излучения, которые при совместном воздействии обуславливают цитотоксический эффект.

В последнее время особое внимание привлекают производные природных хлорофилла и бакте-

риохлорофилла. Выбор обусловлен рядом причин: распространенность в природе, интенсивное поглощение в красной и ближней ИК-областях спектра (650–830 нм), возможность химической модификации боковых заместителей, низкий уровень токсичности и быстрое выведение из организма.

К данному классу соединений относятся производные пиррофторбида *a*, хлорина *e*<sub>6</sub> и *p*<sub>6</sub>, исследования которых представлено в данной работе.

Пирофеофорбиды представляют группу ФС, для которых характерно наличие в спектрах интенсивной полосы поглощения в области 660–670 нм с коэффициентом экстинкции  $3,5\text{--}4,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Квантовый выход синглетного кислорода – 0,5–0,6. Соединения данного класса гидрофобны, введение спиртовых групп, аминокислот, различных углеводных заместителей в молекулу феофорбидов увеличивает гидрофильные свойства ФС и собственно их растворимость в водных растворах. Следует отметить, что конъюгирование ФС углеводными фрагментами может способствовать увеличению их направленной доставки в клетку. Ряд авторов показали высокую противоопухолевую активность производных пирофеофорбида *a* в системах *in vitro* и *in vivo* [1; 6; 7; 9].

В последнее время уделяется пристальное внимание классу природных хлоринов, обладающих рядом преимуществ: они биодegradируются и сравнительно быстро элиминируются из организма; в качестве исходных веществ используются пурпурные бактерии и водоросли, что значительно снижает затраты при синтезе. Хлорины – соединения с  $\lambda_{\text{max}}$  при 665 нм и коэффициентом экстинкции  $2,5\text{--}3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Квантовый выход синглетного кислорода 0,4–0,7. Однако они имеют ограниченное применение в качестве ФС из-за низкой фотостабильности и недостаточной растворимости в биосовместимых средах, поэтому встает необходимость создания более устойчивых красителей, химическая модификация которых позволит оптимизировать гидрофильно-гидрофобный баланс заместителей в макроцикле, что улучшит их фотофизические свойства и растворимость [2; 4; 5].

В статье представлены результаты исследования производных природного хлорофилла *a*: пирофеофорбида *a*, хлорина *e<sub>6</sub>* и *p<sub>6</sub>*, пурпуринимидов в системе *in vitro* с различными боковыми заместителями. Изучены их физико-химические свойства, оценена фотоиндуцированная цитотоксичность относительно опухолевых клеток человека различного эпителиального происхождения *in vitro*.

## Материалы и методы

### Производные пирофеофорбида *a*, хлорина *e<sub>6</sub>* и хлорина *p<sub>6</sub>*

Синтезированы на кафедре химии и технологии биологически активных соединений МИТХТ им. М.В.Ломоносова под руководством проф. А.Ф. Миронова и д.х.н. М.А. Грина. Для растворения использовали 100 %-ный раствор Кремофора EL (содержание кремофора в растворе составляло 10 %). Диапазон концентраций ФС варьировали – для физико-химических исследований от 0,5 до 25 мкМ, для биологических исследований – от 5 нМ до 2 мкМ.

Для изучения биологической (противоопухолевой) активности ФС были отобраны соединения, хорошо растворимые в биосовместимых средах и характеризующиеся устойчивостью в бесклеточной среде в течение 24 часов.

### Исследования *in vitro*

В работе использованы клеточные линии человека (ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванова-ского МЗ РФ): A549 (карцинома легкого), HEp2 (эпидермоидная карцинома гортаноглотки), HT29 (карцинома толстой кишки). В работе использовали клеточные линии от 3 до 18 пассажей. Клетки рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты,

инкубировали в течение 28 ч при +37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub> (стандартные условия). Посевная концентрация клеток устанавливалась для каждой культуры с таким расчетом, чтобы воздействие проходило в экспоненциальной (логарифмической) фазе роста клеток. Далее в планшеты вносили ФС в различных концентрациях (при двух- или трехкратных последовательных разведениях в дуплетах) и проводили облучение галогеновой лампой с набором фильтров, режим облучения – непрерывный. После воздействия светом клетки инкубировали в стандартных условиях 24–28 часов. Оценку выживаемости клеток проводили с использованием МТТ–теста [8]. Уровень ингибирования роста клеток вычисляют по формуле:

$$IP(\%) = \left[ \frac{OD_k - OD_0}{OD_k} \right] \times 100\%, \text{ где}$$

IP – уровень ингибирования роста клеток в культуре; OD<sub>0</sub> и OD<sub>k</sub> – оптическая плотность раствора формазана в опытных и контрольных лунках, соответственно.

Для расчета величины ИК<sub>50</sub> строили кривую роста зависимости ингибирования пролиферации клеточной культуры от концентрации ФС, по которой находили его концентрацию, соответствующую 50 %-ной гибели клеток.

## Результаты и обсуждение

### Производные пирофеофорбида *a*

Нами изучены пирофеофорбид *a* и его гидроксид-, глико- и галактозилные производные (табл. 1), являющиеся гидрофобными соединениями. По данным литературы, конъюгирование красителей углеводными фрагментами может способствовать увеличению направленной доставки ФС в клетку, а также придавать молекуле амфифильный характер, увеличивая растворимость красителей в водных растворах [1; 10].

### Стабильность красителей в динамике в культуральной среде

Как видно из представленных в табл. 2 данных, в культуральной среде с содержанием 7 % ЭТС все изученные соединения характеризовались стабильностью в течение выбранного временного интервала (24 часа). За время наблюдения не отмечалось сдвига максимумов поглощения, снижения величины оптического поглощения, профиль спектра оставался неизменными в течение суток.

### Оценка фотовыцветания по спектрам флуоресценции

При изучении фотовыцветания производных пирофеофорбида *a* показано, что данный класс красителей характеризовался неустойчивостью при воздействии светом (табл. 3).

### Фотоиндуцированная активность производных пирофеофорбида *a* относительно опухолевых клеток в культуре

При оценке биологических свойств ФС оказалось, что соединения **5** и **7**, где углеводный остаток присоединен через атом серы, обладали темновой цитотоксичностью (от 10 до 100 нМ), что делало их неперспективными для дальнейших исследований. У соединений **1–4** и **6** темновой цитотоксичности относительно клеток культуры A549 не выявлено (рис. 1).

Пирофеофорбид *a* (**1**) и его гидроксипроизводное (**2**) проявляли высокую фотоиндуцированную активность в отношении опухолевых клеток A549 (ИК<sub>50</sub> составляла 160±30 нМ и 200±25 нМ). А введение углеводных остатков в пиррольное кольцо А (соединения **3**; **4** и **6**) в значительной степени повышало эффективность ФС при ФДВ (величина ИК<sub>50</sub> составляла 75±5, 40±5 и 80±10 нМ, соответственно; рис. 2).

Отмечено, что все соединения накапливались в клетках со средней скоростью, поскольку временной интервал, при котором наблюдалась максимальная активность у этого класса ФС, составлял 4 часа.

На опухолевых клетках, которые характеризовались высоким уровнем экспрессии углеводсвязывающих рецепторов (HEp2 и HT29), гликозилированные производные пирофеофорбида *a* (**3**; **4** и **6**) проявляли высокую фотоиндуцированную активность, сопоставимую с активностью относительно клеток культуры A549. Величина ИК<sub>50</sub> для соединений **3**; **4** и **6** составляла 82±7 нМ, 35±7 нМ и 74±8 нМ для культуры клеток HEp2 и для 71±8 нМ, 33±5 нМ и 80±10 нМ культуры клеток HT29, соответственно.

#### *Производные хлорина e<sub>6</sub>*

В работе изучали триметиловый эфир хлорина *e<sub>6</sub>* и его гликозилированные производные, представленные в табл. 4.

#### *Стабильность красителей в динамике в культуральной среде*

При изучении абсорбционных и флуоресцентных спектров показано, что триметиловый эфир хлорина *e<sub>6</sub>* (**8**) характеризовался меньшей стабильностью в растворах, оптическая плотность и интенсивность флуоресценции соединения в течение 4 часов оставалась неизменной и незначительно снижалась через сутки инкубации при комнатной температуре.

Гликозилированные производные – стабильны в течение 24 ч инкубации (без воздействия светом). При выбранном временном диапазоне не отмечено снижения величины оптического поглощения и интенсивности флуоресценции в максимумах и изменений профиля спектров (табл. 5).

Как видно из данных, представленных на рис. 3–4, триметиловый эфир хлорина *e<sub>6</sub>* (**8**) и его производные с углеводным заместителем в пирроле С (**10** и **11**) неустойчивы в культуральной среде с содержанием 7 % ЭТС после светового воздействия. Так, при облучении с дозой света 5 Дж/см<sup>2</sup> интенсивность флуоресценции снижалась в 1,5–2 раза относительно показателя, детектированного до воздействия светом, с дальнейшим незначительным фотовыгоранием красителя при увеличении плотности энергии до 10 Дж/см<sup>2</sup>. Выявлено, что фотовыцветание триметилового эфира хлорина *e<sub>6</sub>* с галактозой в пирроле А (**9**) было менее интенсивным, фотовыгорание красителя сопровождалось незначительным снижением интенсивности полосы с максимумом на 670 нм.

#### *Фотоиндуцированная активность производных хлорина e<sub>6</sub> на опухолевых клетках в культуре*

При проведении скрининга производных хлорина *e<sub>6</sub>* на клетках культур различного генеза (HEp2, A549 и HT29) при варьировании концентрации ФС, времени преинкубации до воздействия, а также при облучении с удалением красителей из среды показано, что все соединения представлен-

ного класса проявляли высокую фотоиндуцированную активность *in vitro*. Показано, что все соединения не проявляли темновой цитотоксичности *in vitro* (диапазон концентраций от 3 до 1000 нМ). Введение углеводного остатка в пиррол А (**9**) в значительной степени (в 2–25 раз, в зависимости от клеточной линии) повышало фотоиндуцированную активность ФС, а присутствие углевода в пирроле С (соединение **10**) и замещенного триазольного цикла (соединение **11**), наоборот, снижало фотоактивность красителей как по сравнению с негликозилированным производным (**8**), так и с гликоконъюгатом (**9**).

Все производные триметилового эфира хлорина *e<sub>6</sub>* оказались существенно активнее, чем известный официальный препарат «Радахлорин» (табл. 6).

Выявлено, что представленные производные хлорина *e<sub>6</sub>* проявляли максимальный эффект при ФДВ и 4-часовой инкубации относительно опухолевых клеток культур HEp2, A549 и HT29, с увеличением времени до 6 часов величина ИК<sub>50</sub> изменялась незначительно (рис. 3; 4).

На культуре клеток HEp2 проведена оценка фотоиндуцированной цитотоксичности соединений в зависимости от присутствия в среде во время воздействия светом и с их удалением непосредственно перед облучением. Показано, что эффективность соединений при ФДВ не снижалась при удалении из среды, что косвенно свидетельствовало о проникновении и накоплении ФС в опухолевых клетках (табл. 7).

#### *Производные хлорина p<sub>6</sub>*

Хлорин *p<sub>6</sub>* (**12**) является близким структурным аналогом хлорина *e<sub>6</sub>*, отличающимся заместителем в 15 положении макроцикла. Замена винильной группы на формильную в 3-м положении макроцикла обеспечивает сдвиг максимума до 690 нм (формильное производное хлорина *p<sub>6</sub>* **13**), а введение дополнительного имидного экзоцикла в молекулу хлорина *p<sub>6</sub>* – к еще более существенному сдвигу до 710–715 нм.

При этом варьирование заместителей в пирроле А (R<sub>1</sub>) и экзоцикле Е (R<sub>2</sub>) позволило сместить длинноволновую полосу поглощения в область 724 – 746 нм [3]. В табл. 8 представлены изученные циклоимидные производные хлорина *p<sub>6</sub>* с различными заместителями в макроцикле

#### *Стабильность красителей в динамике в культуральной среде*

При проведении абсорбционного и флуоресцентного анализа показано, что все представленные соединения не подвергались деградации в культуральной среде и характеризовались стабильностью в течение выбранных временных интервалах (не отмечено появления дополнительных пиков и снижение оптической плотности в Q-полосе для всех ФС; табл. 9).

При оценке фотовыцветания ряда производных хлорина *p<sub>6</sub>* выявлено, что соединения **20** и **23** подвергались фотобликингу в меньшей степени, чем соединения **17**; **19** и **22** (табл. 10).

#### *Фотоиндуцированная активность производных хлорина p<sub>6</sub> на опухолевых клетках в культуре*

Все соединения характеризовались отсутствием темновой цитотоксичности относительно клеток A549. Оценка фотоиндуцированной активности хлорина *p<sub>6</sub>* и его производных показала, что введение заместителей в макроцикл красителя существенным образом увеличивало эффективность производных при ФДВ.

Таблица 1

Пирофеофорбид а и его производные

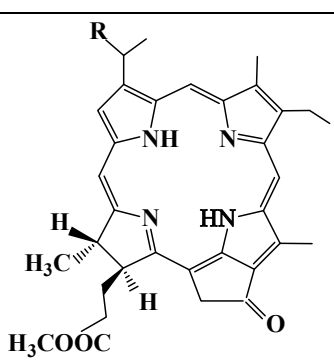
ФС	Тип макроцикла	Тип бокового заместителя (R)
1		-CH=CH <sub>2</sub>
2		-OH
3		-O-CH <sub>2</sub> -Gal
4		-O-CH <sub>2</sub> -Glu
5		-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -O-Gal
6		-O-Gal
7		-S-Glu

Таблица 2

Стабильность пирофеофорбида а и его производных в среде Игла, содержащей 7%ЭТС

ФС	Время инкубации, часы					
	Ex tempore		2		24	
	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	OD, усл.ед.	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	OD, усл.ед.	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	OD, усл.ед.
1*	672	0,55±0,03	672	0,53±0,01	672	0,53±0,03
2*	662	0,42±0,02	662	0,40±0,01	662	0,4±0,02
3*	662	0,47±0,02	662	0,46±0,02	662	0,45±0,03
4*	660	0,56±0,01	660	0,54±0,01	660	0,55±0,02
5*	663	0,38±0,02	663	0,37±0,02	663	0,37±0,02
6*	662	0,32±0,01	662	0,32±0,01	662	0,32±0,01
7*	662	0,45±0,03	662	0,45±0,01	662	0,45±0,01

Соединение	Время инкубации, часы					
	Ex tempore		2		24	
	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.
1**	675	198,0±1,7	675	195,0±2,5	675	195,0±3,0
2**	670	139,0±1,9	670	137,0±0,8	670	136,0±0,8
3**	670	150,0±2,8	670	147,0±4,2	670	149,0±1,8
4**	670	230,0±3,5	670	227,0±4,2	670	228,0±2,7
5**	670	110,0±0,7	670	99,0±3,4	670	100,0±1,2
6**	670	83,0±4,0	670	80,0±0,9	670	82,0±2,6
7**	662	143,0±2,9	662	140,0±3,8	662	141,0±3,2

\*концентрация ФС 15 мкМ;  
\*\*концентрация ФС в растворе 2 мкМ.

Таблица 3

Устойчивость пирофеофорбида а и его производных при воздействии светом в бесклеточной среде. Концентрация ФС в растворах 2 мкМ

ФС	Доза света, Дж/см <sup>2</sup>					
	до облучения		5		10	
	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.	L <sub>max</sub> , <sub>HM</sub>	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.
1	675	200,0±2,8	675	82,0±3,7	675	74,0±0,8
2	670	137,0±2,0	670	70,0±2,8	670	58,0±1,9
3	670	154,0±3,2	670	63,0±4,3	670	55,0±2,5
4	670	220,0±1,5	670	108,0±4,2	670	87,0±2,8
5	670	107,0±3,0	670	45,0±5,1	670	37,0±3,5
6	670	80,0±2,7	670	38,0±2,5	670	25,0±4,1
7	662	140,0±1,6	662	68,0±3,0	662	54,0±3,3

Таблица 4

Производные хлорина  $e_6$ 

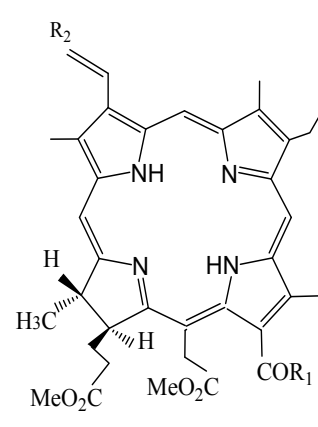
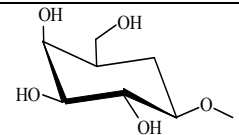
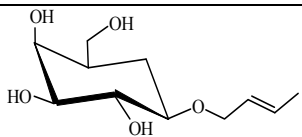
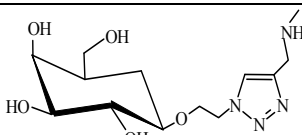
ФС	Тип макроцикла	Заместители	
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
8		-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub>
9		-OCH <sub>3</sub>	
10			-CH <sub>2</sub>
11			-CH <sub>2</sub>

Таблица 5

Стабильность растворов гликозилированных производных хлорина  $e_6$  в среде Игла, содержащей 7 %ЭТС

ФС	Время инкубации, часы							
	ex tempore		2		4		24	
	$\lambda$ , нм	OD, усл.ед	$\lambda$ , нм	OD, усл.ед	$\lambda$ , нм	OD, усл.ед	$\lambda$ , нм	OD, усл.ед
8*	665	0,75±0,03	665	0,75±0,04	665	0,72±0,03	664	0,57±0,04
9*	667	0,88±0,03	667	0,86±0,04	667	0,84±0,03	667	0,77±0,02
10*	667	0,37±0,02	667	0,36±0,02	667	0,37±0,03	667	0,38±0,02
11*	667	0,85±0,03	667	0,82±0,03	667	0,81±0,04	667	0,78±0,04
ФС	Время инкубации, часы							
	ex tempore		2		4		24	
	$\lambda$ , нм	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед	$\lambda$ , нм	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед	$\lambda$ , нм	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед	$\lambda$ , нм	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед
8**	670	116,0±10,8	670	110,0±13,8	670	99±2,9	670	89±3,4
9**	670	222,0±8,2	670	224,0±3,5	670	221,0±2,1	670	219,0±1,7
10**	660	80,0±2,1	660	75,0±1,4	660	71,0±1,9	660	76,0±0,7
11**	670	168,0±4,2	670	156,0±4,3	670	156,0±1,7	670	160,0±4,2

\*концентрация ФС в растворе 25 мкМ; \*\*концентрация ФС в растворе 0,5 мкМ.

Таблица 6

Сравнительная фотоиндуцированная активность Радахлорина, триметилового эфира хлорина  $e_6$  и его производных

ФС	ИК <sub>50</sub> , нМ		
	HEp2	A549	HT29
Радахлорин	5500±300	6100±450	7500±550
Триметилловый эфир хлорина $e_6$ (8)	200±25	150±48	400±43
Триметилловый эфир хлорина $e_6$ с галактозой в пирроле А (9)	15±8	70±19	34±16
Триметилловый эфир хлорина $e_6$ с галактозой в пирроле С (10)	200±55	700±47	400±27
Триметилловый эфир хлорина $e_6$ с галактозой и триазолом в пирроле С (11)	400±35	700±41	600±38

Таблица 7

Фотоиндуцированная активность гликоконъюгатов в зависимости от их присутствия в среде во время облучения

ФС	Облучение в присутствии ФС	Облучение без ФС в среде инкубации
	ИК <sub>50</sub> , нМ	
Триметилловый эфир хлорина $e_6$ (8)	240±50	260±32
Триметилловый эфир хлорина $e_6$ с галактозой в пирроле А (9)	27±7	29±13
Триметилловый эфир хлорина $e_6$ с галактозой в пирроле С (10)	290±25	320±20
Триметилловый эфир хлорина $e_6$ с галактозой и триазолом в пирроле С (11)	450±32	550±41



Таблица 8

Хлорина  $p_6$  и его производные

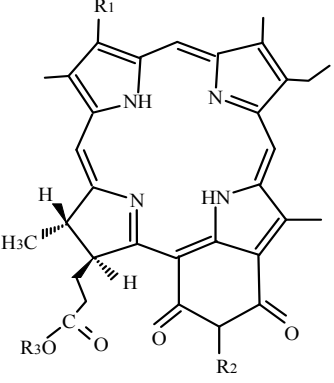
ФС	Тип макроцикла	Заместители		
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
14		-CH=CH <sub>2</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	H
15		-CH=CH <sub>2</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	H
16		-CH=CH <sub>2</sub>	-OCOCH <sub>3</sub>	H
17		-CH=CH <sub>2</sub>	-OH	CH <sub>3</sub>
18		-CH=CH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> COOH	CH <sub>3</sub>
19		-CH=CH <sub>2</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	CH <sub>3</sub>
20		-CHO	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	H
21		-CH=CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
22		-CH=NOH	-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
23		-CHO	-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Таблица 9

Стабильность хлорина  $p_6$  и его производных в среде Игла, содержащей 7% ЭТС. Концентрация ФС в растворе 15 мкМ

ФС	Время инкубации, часы					
	Ex tempore		2		24	
	Л <sub>max</sub> , нМ	OD, усл.ед.	Л <sub>max</sub> , нМ	OD, усл.ед.	Л <sub>max</sub> , нМ	OD, усл.ед.
1	2	3	4	5	6	7
12*	665	0,34±0,03	665	0,32±0,04	665	0,30±0,03
13*	665	0,29±0,02	665	0,25±0,01	665	0,22±0,01
14*	716	0,37±0,02	716	0,36±0,01	716	0,35±0,02
15*	712	0,41±0,02	712	0,42±0,02	712	0,4±0,02
16*	712	0,45±0,02	712	0,47±0,02	712	0,46±0,02
17*	715	0,62±0,02	715	0,63±0,03	715	0,61±0,01
18*	708	0,33±0,02	708	0,32±0,01	708	0,33±0,01
19*	708	0,35±0,01	708	0,36±0,02	708	0,35±0,01
1	2	3	4	5	6	7
20*	746	0,31±0,02	746	0,32±0,03	746	0,31±0,02
21*	710	0,41±0,02	710	0,43±0,03	710	0,42±0,01
22*	720	0,37±0,02	720	0,36±0,01	720	0,35±0,02
23*	740	0,26±0,02	740	0,25±0,04	740	0,22±0,03
	Л <sub>max</sub> , нМ	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.	Л <sub>max</sub> , нМ	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.	Л <sub>max</sub> , нМ	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.
12**	670	150,0±5,8	670	145,0±5,1	670	144,0±2,8
13**	670	145,0±4,7	670	140,0±6,1	670	142,0±2,1
17**	720	182±3	720	174,0±5,5	720	175,0±4,1
19**	725	210,0±2,9	725	200,0±4,7	725	201,0±4,5
20**	755	190,0±5,1	755	187,0±2,2	755	188,0±2,4
22**	730	192,0±2,3	730	189,0±1,8	730	188,0±3,3
23**	750	187,0±3,9	750	179,0±2,0	750	180,0±5,1

\*концентрация ФС 15 мкМ;

\*\*концентрация ФС 1 мкМ.

Таблица 10

Устойчивость циклоимидных производных хлорина  $p_6$  при воздействии светом в культуральной среде. Концентрация ФС в растворах 1 мкМ.

ФС	Доза света, Дж/см <sup>2</sup>					
	до облучения		5		10	
	$L_{\max}$ , нМ	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.	$L_{\max}$ , нМ	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.	$L_{\max}$ , нМ	IFЧ10 <sup>3</sup> , усл.ед.
17	720	179,0±3,4	720	79,0±1,5	720	65,0±0,7
19	725	199,0±3,5	725	94,0±2,8	725	85,0±2,8
20	755	187,0±4,1	755	120,0±3,5	755	100,0±2,2
22	730	181,0±1,8	730	87,0±3,4	730	75,0±3,3
23	750	190,0±2,3	750	130,0±2,4	750	108,0±1,8

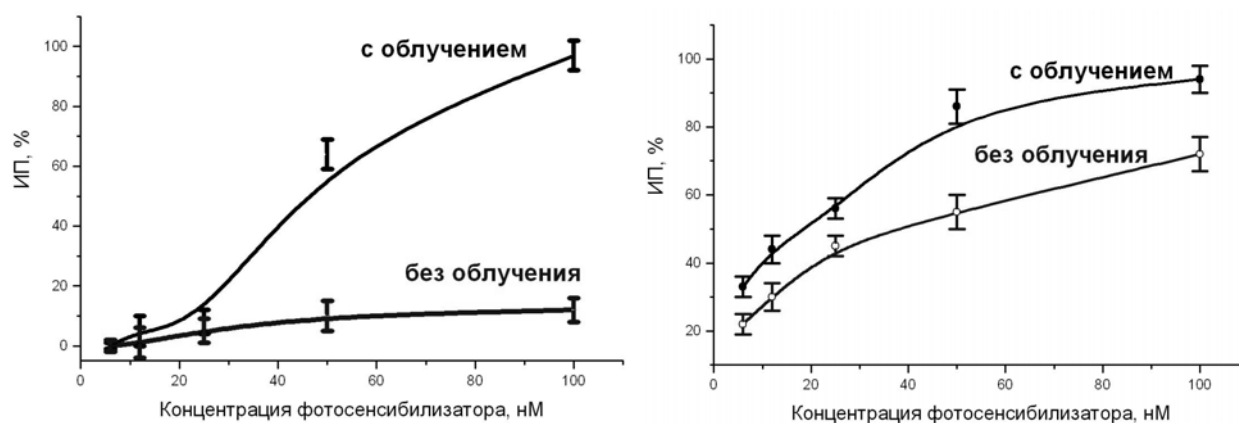


Рис. 1. Фото- и цитотоксичность гликозильного (4, 1) и галактозильного производного пиррофеофорбида  $a$  (7, 2).

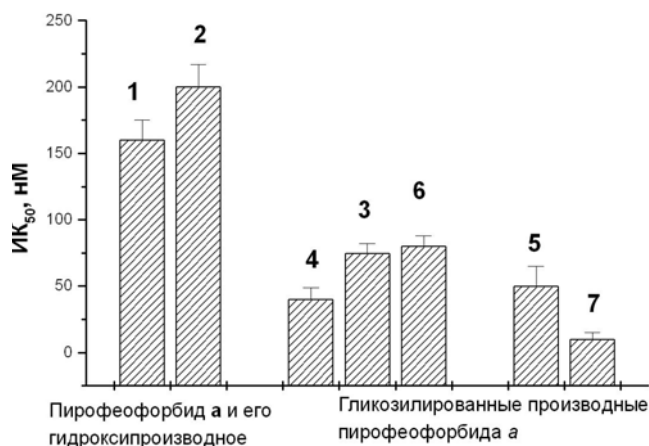


Рис. 2. Фотоиндуцированная активность пиррофеофорбида  $a$  и его производных. Культура клеток A549. Время инкубации 4 часа.

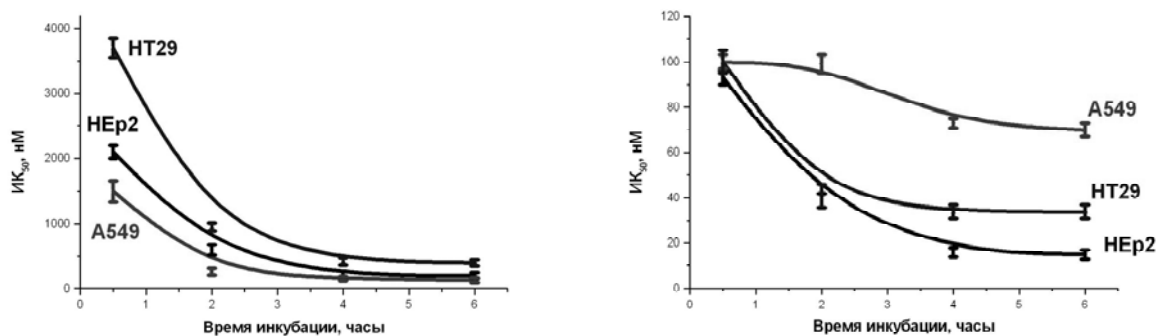


Рис. 3. Фотоиндуцированная активность триметилевого эфира хлорина  $e_6$  (8, 1) гликоконъюгата с галактозой в пирроле А (9, 2) в зависимости от времени инкубации

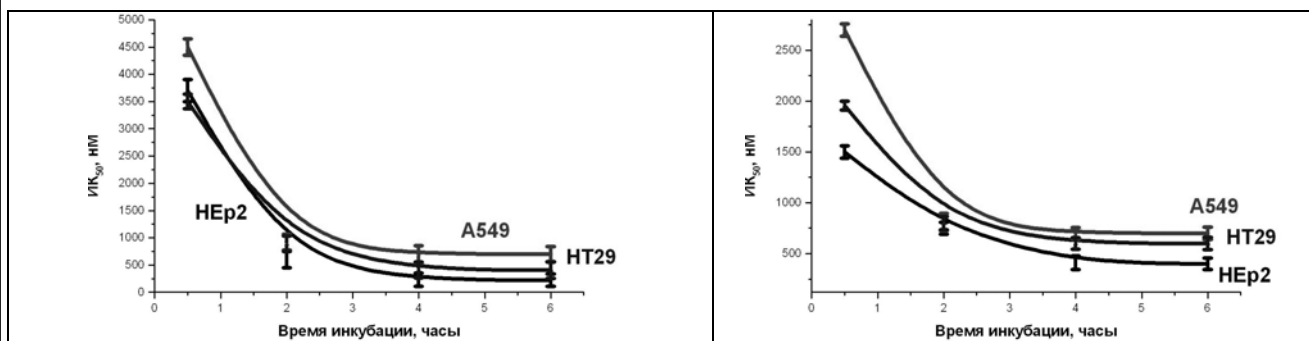


Рис. 4. Фотоиндуцированная активность гликоконъюгата с галактозой в пирроле С (10, 1) и с галактозой и триазолом в пирроле С (11, 2) в зависимости от времени инкубации.

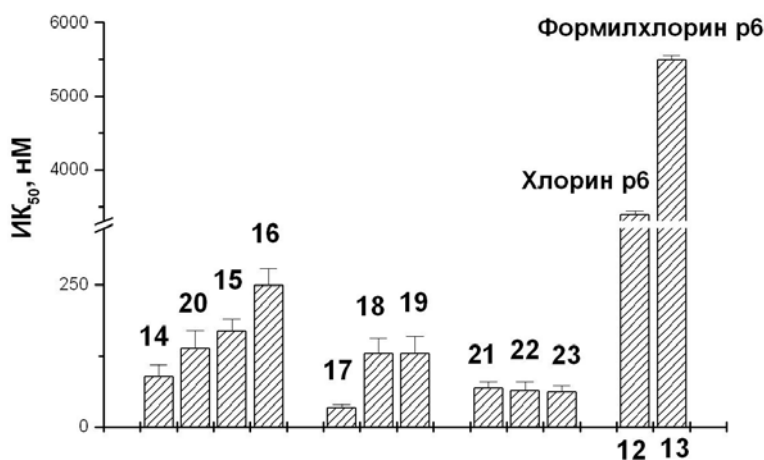


Рис. 5. Фотоиндуцированная активность хлорина  $p_6$  и его циклоимидных производных. Время инкубации 2 часа. 12 –  $3400 \pm 45$  нМ; 13 –  $5500 \pm 55$  нМ; 14 –  $90 \pm 20$  нМ; 15 –  $170 \pm 20$  нМ; 16 –  $250 \pm 30$  нМ; 17 –  $35 \pm 10$  нМ; 18 –  $130 \pm 26$  нМ; 19 –  $130 \pm 30$  нМ; 20 –  $140 \pm 30$  нМ; 21 –  $70 \pm 10$  нМ; 22 –  $65 \pm 15$  нМ; 23 –  $63 \pm 10$  нМ.

Как видно из данных, представленных на рис. 5, наибольшая активность выявлена у ФС с гидроксильной группой в экзоцикле (17; величина  $IC_{50}$  составляла  $35 \pm 10$  нМ); удлинение углеводородной цепи в этом положении (соединения 18 и 19) существенно снижало фотоиндуцированную активность ( $IC_{50} - 130 \pm 26$  нМ и  $127 \pm 30$  нМ соответственно). Соединения с ярко выраженными липофильными свойствами (21–23), характеризовались более высокой активностью: величина  $IC_{50}$  в среднем составляла  $67 \pm 15$  нМ. В ряду соединений 14–16 активность, напротив, убывала с укорочением алкильного радикала в экзоцикле Е (величина  $IC_{50} - 90 \pm 15$  нМ,  $170 \pm 18$  нМ и  $250 \pm 23$  нМ соответственно). Полученные результаты показывают, что, варьируя структуру боковых заместителей и их положение в макроцикле, можно в значительной степени влиять на эффективность ФС при ФДВ. Отмечено, что временной интервал, при котором соединения проявляли максимальную фотоиндуцированную цитотоксичность, составлял 2 ч, все красители проникали в клетки и накапливались в них.

#### Заключение

Таким образом, при оценке физико-химических и фотофизических свойств производных пиррофторбида а показано, что соединения характеризовались стабильностью в растворах без воздействия светом, но оказались неустойчивыми при облучении. Пиррофторбид а (1) и его гидроксипроизводное (2) имели высокую фотоиндуцированную активность относительно опухолевых клеток в культуре (величина  $IC_{50}$  составляла  $160 \pm 30$  нМ и  $200 \pm 25$  нМ, соответственно).

Присоединение углеводного фрагмента к пиррольному кольцу А увеличивало эффективность соединений 3; 4 и 6 в 2-5 раз по сравнению как с исходным пиррофторбидом (1), так и с его гидроксильным производным (2). Однако, несмотря на высокую активность большинства соединений, ФС данного класса не были отобраны для дальнейшего изучения. К недостаткам гликоконъюгатов следует отнести трудоемкий и дорогостоящий синтез, а также наличие максимума поглощения при  $\lambda_{max} = 660 - 665$  нм.

Оценка физико-химических и фотофизических свойств производных хлорина  $e_6$  (8-11) показала, что все представленные ФС стабильны в растворах без облучения и подвергались фотовыцветанию при воздействии светом.

При оценке фотоиндуцированной противоопухолевой активности отмечено, что эффективность триметилового эфира хлорина  $e_6$  превышала активность Радахлорина в 20–40 раз. Введение заместителей в пиррол С приводило к снижению активности красителей, как по сравнению с неконъюгированным аналогом (8), так и с гликоконъюгатом (9). А введение галактозного остатка в пиррол А макроцикла значительно повышало эффективность производных хлорина  $e_6$ , по сравнению с пиррофторбидом а (величина  $IC_{50}$  составляла  $15 \pm 8$  нМ и  $200 \pm 25$  нМ, соответственно). Однако, несмотря на положительные результаты в биологических тестах *in vitro*, наличие у этих соединений максимума поглощения при 665 нм, где отсутствует глубокое проникновение света в ткани, а также сложность и трудоемкость их химического синтеза делают дальнейшее изучение данной группы ФС нецелесообразным.

При изучении физико-химических свойств хлорина  $p_6$  и его производных показано, что все ФС характеризовались стабильностью в растворах и относительной устойчивостью при воздействии светом. Внутримолекулярная циклизация и введение ряда электроноакцепторных заместителей в макроцикл хлорина  $p_6$  ( $\lambda_{\max}=660$  нм) в значительной степени смещала максимум поглощения его модифицированных производных в более длинновол-

ную область спектра ( $\lambda_{\max}=710-740$  нм) и увеличивала фотоиндуцированную активность ФС по сравнению с хлорином  $p_6$  и его формильным производным. Так, эффективность хлорина  $p_6$  и его формильного производного была в 100-150 раз ниже, чем у наиболее активного циклоимидного производных хлорина  $p_6$  (величина  $IK_{50}$  составляла  $35\pm 10$  нМ), который был выбран для дальнейшего изучения в системе *in vivo*.

### Литература

1. Аксенов А.А., Себякин Ю.Л., Миронов А.Ф. Синтез и изучение свойств О- и S- гликозилированных производных пиррофеофорбида *a* // Биоорганическая химия. – 2001. – 27(2). – Р. 145–50.
2. Назарова А.И., Феофанов А.В., Кармакова Т.А. и др. Влияние заместителей на фотохимические и биологические свойства 13,15-N-циклоимидных производных хлорина  $p_6$  // Биоорганическая химия. – 2005. – 31(5). – С. 535–48.
3. Рузиев Р.Д. Синтез и изучение свойств гидроксилсодержащих циклоимидных производных хлорина  $p_6$ . Дисс. ...к.х.н. – М., 2005.
4. Feofanov A., Sharonov G., Grichine A. et. al. Comparative study of photodynamic properties of 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin  $p_6$  // Photochem. Photobiol. – 2004. – 79(2). – P. 172–88.
5. Grin M.A., Lonin I.S., Makarov A.I. et.al. Synthesis of chlorin-carbohydrate conjugates by «click chemistry» // Mendeleev Commun. – 2008. – 3(18). – P. 135–7.
6. Hajri A, Wack S, Meyer C. et. al. In vitro and in vivo efficacy of photofrin and pheophorbide a, a bacteriochlorin, in photodynamic therapy of colonic cancer cells // Photochem Photobiol. – 2002. – 75(2). – P. 140–8.
7. Luo T., Wilson B.C., Lu Q.B. Evaluation of one- and two-photon activated photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human cervical, lung and ovarian cancer cells // J. Photochem Photobiol B. – 2014. – 5(132). – P. 102–10.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: application to proliferation and cytotoxicity assay // Journal of Immunological Methods. – 1983. – 65. – P. 55–63.
9. Wu D., Liu Z., Fu Y., Zhang Y. et al. Efficacy of 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a in photodynamic therapy of human esophageal squamous cancer cells // Oncol Lett. – 2013. – 6(4). – P. 1111–9.
10. Zhang M., Zhang Z., Blessington D. et al. Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters // Bioconjugate Chem. – 2003. – 14(4). – P. 709–14.

Использованные автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 616-006.3.04:616.92.9:615.832.3

М.А. Каплан<sup>1</sup>, А.И. Малыгина<sup>1</sup>, Г.В. Пономарев<sup>2</sup>, А.А. Михайловская<sup>1</sup>,  
В.В. Дрожжина<sup>1</sup>, Л.М. Архипова<sup>1</sup>, Ю.С. Осипчук<sup>1</sup>

### ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ САРКОМЫ М-1 КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА АМИДАМИНХЛОРИНА

<sup>1</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва

#### Контактная информация

Михайловская Анастасия Александровна, зав. лабораторией экспериментальной фотодинамической терапии

адрес: 249038 Калужская область, г. Обнинск, ул. Любого, д.11, кв. 83; тел. +7(484)399-70-29

e-mail: [an\\_mikh@mail.ru](mailto:an_mikh@mail.ru)

Статья поступила 09.07.2014, принята к печати 09.02.2015.

#### Резюме

В эксперименте на модели опухоли саркома М-1 изучена эффективность внутрибрюшинного введения амидаминхлорина как фотосенсибилизатора при проведении ФДТ. Цель исследования – определить параметры минимально эффективной дозы ФС и лазерного излучения при ФДТ для достижения полной регрессии опухоли. Изучали динамику накопления фотосенсибилизатора в опухоли и здоровой ткани для определения времени проведения ФДТ и противоопухолевую эффективность при разных дозах ФС и различных параметрах лазерного излучения. В результате проведенного исследования был определен оптимальный срок проведения ФДТ и установлена минимально эффективная доза ФС и параметры лазерного излучения.

**Ключевые слова:** опухоль, фотосенсибилизатор, лазер, динамика накопления.

М.А. Kaplan<sup>1</sup>, А.И. Malygina<sup>1</sup>, G.V.Ponomarev<sup>2</sup>, А.А. Mikhailovskaya<sup>1</sup>,  
V.V. Drozhzhina<sup>1</sup>, L.M. Arkhipova<sup>1</sup>, J.S. Osipchuk<sup>1</sup>

### PHOTODYNAMIC THERAPY OF RAT SARCOMA M-1 WITH PHOTOSENSITIZER AMIDOAMINCHLORINE

<sup>1</sup>A. Cyb Scientific Centre of Radiology of the Hertsen Federal Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk

<sup>2</sup>Institute of biomedical chemistry, Moscow

#### Abstract

Efficacy of photodynamic therapy with intraperitoneal introduction photosensitizer Amidoaminchlorine on rat sarcoma M1 model was studied.

The aim of this study was to determine minimum effective dose of photosensitizer and parameters of laser radiation for achievement of tumor full regress.

Dynamics of photosensitizer accumulation in tumor and healthy tissues was studied to definite the time of photodynamic therapy. Antitumor efficacy different doses of photosensitizer and various parameters of laser radiation were investigated. As a result, optimal term of photodynamic therapy, photosensitizer minimum effective dose and parameters of laser irradiation were established.

**Key words:** tumor, photosensitizer, laser, dynamics of accumulation.

#### Введение

ФДТ – метод лечения злокачественных опухолей, основанный на способности ФС селективно накапливаться в ткани опухоли вследствие особенностей биохимии злокачественной клетки и, при локальном воздействии лазерного облучения определенной длины волны, генерировать образование синглетного кислорода и других активных радикалов, оказывающих цитотоксический эффект на опухолевые клетки [3; 4; 6–10; 12–14]. Кроме прямого цитотоксического воздействия ФДТ на опухолевые клетки важную роль в деструкции новообразования играют: нарушение кровоснабжения за счет повреждения эндотелия кровеносных сосудов опухолевой ткани; цитокиновые реакции, обусловленные стимуляцией продукции фактора некроза опухоли, активацией макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов. Прогресс ФДТ опухолей связан с созданием эффективных ФС, обеспечивающих доста-

точный терапевтический эффект при минимальном повреждении окружающих здоровых тканей и отсутствии общетоксического действия. В настоящее время большой интерес в ФДТ злокачественных новообразований в качестве ФС вызывают производные ряда хлорофилла [15]. Вновь созданный амидаминхлорин является химической модификацией периферических заместителей хлорина е6. Спектральные характеристики амидаминхлорина позволяют использовать его с теми же лазерами, которые используются для других ФС хлоринового ряда, т. е. с максимумом излучения при длине волны 662 нм [1; 5; 16; 17].

**Цель работы** – определить минимально эффективную дозу ФС и параметров лазерного излучения для достижения полной регрессии опухоли у 100 % животных.

Задачи исследования:

- изучить динамику накопления амидаминхлорина в опухоли и здоровой ткани;

- изучить противоопухолевую эффективность ФДТ саркомы М-1 при разных дозах ФС амидоаминхлорина (внутрибрюшинное введение) и различных параметрах лазерного излучения.

### Материалы и методы

Исследования были проведены на 62 беспородных крысах. В качестве экспериментальной модели опухоли использовали саркому М-1 крыс [2]. Опухоль перевивали под кожу в область бедра в виде кусочков опухоли донора. В опыт крыс брали на 7–9 день, когда опухоль достигала 0,7–1,0 см в диаметре, шерстный покров депилировали. В качестве ФС использовали амидоаминхлорин, который вводили внутрибрюшинно в разных дозах.

#### Изучение динамики накопления ФС в опухоли и здоровой ткани крыс

Для изучения динамики накопления амидоаминхлорин вводили крысам с саркомой М-1 внутрибрюшинно в дозе 2,5 мг/кг.

Уровень накопления ФС оценивали по интенсивности флуоресценции. Измерение уровня накопления ФС в опухолевой и здоровой тканях изучали с помощью спектрофлуоресцентного метода на комплексе «ЛЭСА-01-Биоспек» (Россия). Датчики подводили к коже над опухолью и в трех точках под прямым углом к объекту (центр, периферия 1 и периферия 2). Накопление в здоровой ткани определяли на здоровой ткани бедра с опухолью (контроль 1) и на противоположенном бедре (контроль 2). Перед измерением шерстный покров депилировали. Время экспозиции составляло 1–2 с. В различные сроки времени после введения ФС у каждого животного измеряли спектры опухолевой и здоровой тканей. Первое измерение проводили до введения препарата (0 ч), а затем через 20 мин; 1,0; 1,5; 3,0; 4,0 и 5,5 ч.

Для суждения о селективности накопления ФС в опухоли по отношению к здоровой ткани рассчитывали индекс контрастности (опухоль/здоровая ткань).

#### Изучение параметров эффективной дозы ФС и лазерного излучения

В опыте было 5 групп животных. ФДТ проводили разными дозами ФС и различными параметрами лазерного излучения:

- 1 группа – доза ФС 1,25 мг/кг, 100 Дж/см<sup>2</sup>, 0,34 Вт/см<sup>2</sup>;
- 2 группа – доза ФС 1,25 мг/кг, 150 Дж/см<sup>2</sup>, 0,34 Вт/см<sup>2</sup>;
- 3 группа – доза ФС 1,25 мг/кг, 150 Дж/см<sup>2</sup>, 0,51 Вт/см<sup>2</sup>;
- 4 группа – доза ФС 2,5 мг/кг, 150 Дж/см<sup>2</sup>, 0,51 Вт/см<sup>2</sup>;
- 5 группа – доза ФС 2,5 мг/кг, 300 Дж/см<sup>2</sup>, 0,51 Вт/см<sup>2</sup>.

Контроль – крысы-опухоленосители без какого-либо воздействия.

Животные при облучении находились под общим тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно 2,5 % раствор в объеме 0,2 мл/100 г массы животного).

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый лазерный аппарат «Аткус-2» производства ЗАО «Полупроводниковые приборы» (Санкт-Петербург) с длиной волны излучения 662±1 нм. Диаметр светового пятна составлял 1,5

см. Объем опухоли измеряли: до проведения ФДТ (V<sub>0</sub>), на 3; 7; 10; 14 и 21 сутки после ФДТ. Эффективность ФДТ оценивали по коэффициенту абсолютного прироста опухоли и по эффекту ингибирования роста опухоли (по рекомендации Фармкомитета по предклинической апробации препаратов [11]):

1. По коэффициенту абсолютного прироста опухоли (К). Для этого сначала вычисляли объемы опухолей по формул:

$$V = \frac{1}{6} \pi \times d_1 \times d_2 \times d_3, \text{ где}$$

d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, d<sub>3</sub> – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли, V – объем опухоли, см<sup>3</sup>.

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (К) рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0}, \text{ где}$$

V<sub>0</sub> – объем опухоли до воздействия,

V<sub>t</sub> – объем опухоли на определенный срок наблюдения.

2. По торможению роста опухоли (ТРО, %). показатель вычисляли по формуле:

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

V<sub>k</sub> – средний объем опухоли в контрольной группе,

V<sub>o</sub> – средний объем опухоли в опытной группе.

3. По проценту животных с полной регрессии (ПР, %) опухоли (K = -1,00). За полную регрессию опухоли мы принимали отсутствие видимой и пальпируемой опухоли.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в компьютерной программе «Statistica» непараметрическими методами для независимых групп (описательная статистика, метод U–теста Манна-Уитни).

### Результаты и обсуждение

#### Изучение динамики накопления ФС в опухоли и здоровой ткани

Уровень и селективность накопления ФС в опухоли, а также скорость его выведения из нормальной ткани являются важнейшими характеристиками для ФДТ. Они влияют как на эффективность метода, так и на вероятность снижения побочных эффектов.

Из данных, представленных на рисунке, видно, что в течение 5,5 ч после внутрибрюшинного введения амидоаминхлорина в дозе 2,5 мг/кг происходит постепенное увеличение уровня накопления его как в опухоли, так и в здоровой ткани. Максимальный уровень накопления ФС в опухоли наблюдался через 3,0–5,5 ч после введения ФС. Что касается индекса контрастности, то самый высокий (1,8) мы наблюдали через 3 часа.

Таблица

Динамика роста саркомы М-1 крыс после ФДТ при внутрибрюшинном введении амидоаминхлорина в разных дозах при различной плотности энергии и плотности мощности лазерного излучения

№ гр	Схема проведения ФДТ	1. Объём опухоли, V 2. Коэффициент прироста опухоли, К 3. Торможение роста опухоли, ТРО % 4. Полная регрессия опухоли, ПР %					
		Сроки наблюдений					
		3сутки	7 сутки	10 сутки	14 сутки	21 сутки	
1	1,25 мг/кг 100 Дж/см <sup>2</sup> 0,34 Вт/см <sup>2</sup>	0,266±0,036 0,62±0,20* 57,6 0	0,392±0,150 1,59±1,07* 82,8 44,4	0,533±0,241 2,75±1,70* 86,2 55,6	0,929±0,430 5,62±3,14* 87,5 55,6	4,538±1,904 30,98±13,35 67,1 55,6	
2	1,25 мг/кг 150 Дж/см <sup>2</sup> 0,34 Вт/см <sup>2</sup>	0,023±0,016 -0,85±0,10* 96,3 77,8	0,125±0,076 -0,14±0,52* 94,5 66,7	0,284±0,187 0,70±1,17* 92,6 66,7	1,082±0,685 5,52±4,32* 85,4 66,7	4,695±2,330 28,11±14,34 70,9 55,6	
3	1,25 мг/кг 150 Дж/см <sup>2</sup> 0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных		0,046±0,035 -0,39±0,45* 98,0 62,5	0,088±0,051 0,16±0,67* 97,7 62,5	0,332±0,182 3,16±2,38* 95,6 50,0	1,035±0,453 11,88±6,07* 92,5 50,0
4	2,5 мг/кг 150 Дж/см <sup>2</sup> 0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных		0,006±0,006 -0,80±0,20* 99,8 87,5	0,083±0,039 -0,01±0,50* 98,9 50,0	0,288±0,144 3,79±2,68* 97,9 50,0	
5	2,5 мг/кг 300 Дж/см <sup>2</sup> 0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных					
Контроль (V, К)		0,627±0,055 2,97±0,50	2,287±0,204 14,01±2,05	3,858±0,433 20,73±2,04	7,461±1,014 36,00±3,85	13,787±1,543 65,31±7,70	

\* $p < 0,05$  статистически достоверно по сравнению с контролем

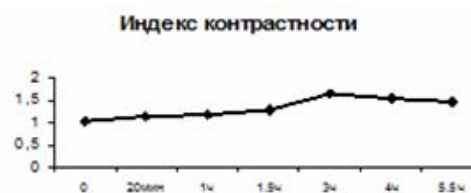
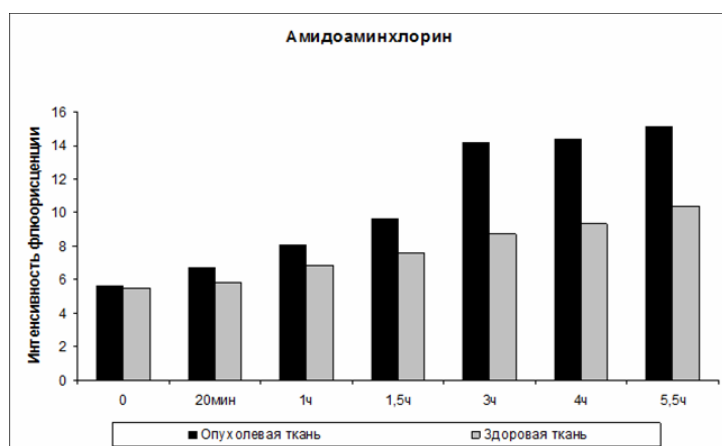


Рис. амидоаминхлорина в опухоли и здоровой ткани крыс с саркомой М-1:

А – уровень накопления;

Б – индекс контрастности.

Таким образом, оптимальное время проведения лазерного облучения после введения ФС наступает через 3 часа – т.е. в это время мы имеем высокое накопление ФС в опухолевой ткани и минимальное содержание его в здоровых тканях.

#### Изучение параметров эффективной дозы ФС и лазерного излучения

Результаты исследований в 1 группе показали, что при дозе ФС 1,25 мг/кг при плотности энергии 100 Дж/см<sup>2</sup> и плотности мощности 0,34 Вт/см<sup>2</sup> лазерного излучения на 21 сутки после ФДТ полная регрессия отмечалась у 55,6 % крыс. У животных с ростом опухоли наблюдалось снижение темпа при-

роста новообразования по сравнению с таковым в контроле. И это снижение до 14 суток исследования достоверно значимо ( $p < 0,001$ ). И хотя на 21 сутки наблюдения коэффициент абсолютного прироста опухоли в опытной группе ниже, чем в контроле, и составлял 30,98±13,35, это снижение уже не было значимым по сравнению с таковым в контроле (65,31±7,70;  $p < 0,142$ ). ТРО на 21 сутки после ФДТ составляло 61,7 % (см. таблицу).

Во 2 группе при увеличении плотности энергии до 150 Дж/см<sup>2</sup>, но при той же дозе ФС и плотности мощности лазерного излучения (1,25 мг/кг, 0,34 Вт/см<sup>2</sup>) мы наблюдали увеличение процента ПР и ТРО до 14 суток исследования. Но на 21 сутки наблюдения процент ПР опухоли и ТРО практически не отличались от данных группы



1. Коэффициент абсолютного прироста опухоли у животных составил на 21 сутки  $28,11 \pm 14,13$  и также достоверно незначим по сравнению с таковым контролем ( $p < 0,086$ ).

В 3 группе при увеличении плотности мощности до  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ , но при той же дозе ФС и плотности энергии ( $1,25 \text{ мг/кг}$  и  $150 \text{ Дж/см}^2$ ) мы получили хороший ингибирующий эффект. На 21 сутки наблюдения ТРО составляло  $92,5\%$  при  $50\%$  ПР опухоли. Снижение прироста опухоли на 21 сутки после ФДТ отмечалось по сравнению с группой 2 и достоверно ниже, чем в контроле ( $11,88 \pm 6,07$ ;  $p < 0,002$ ).

В 4 группе при увеличении дозы ФС до  $2,5 \text{ мг/кг}$ , но при тех же параметрах лазерного облучения как в группе 3 ( $150 \text{ Дж/см}^2$  и  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ ), наблюдалось усиление противоопухолевого воздействия. До 7 суток исследования отмечалась полная регрессия опухоли у всех животных в группе. На 21 сутки исследования ТРО составляло  $97,9\%$  при  $50\%$  ПР опухоли, коэффициент абсолютного прироста у животных с ростом опухоли ( $3,79 \pm 2,68$ ) отличался от коэффициента в группе 3 и значительно отличался от контроля ( $p < 0,001$ ).

В 5 группе при увеличении плотности энергии в 2 раза ( $300 \text{ Дж/см}^2$ ) при той же дозе ФС и плотности мощности ( $2,5 \text{ мг/кг}$ ,  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ ) до 21 суток после ФДТ наблюдалась полная регрессия опухоли у всех животных.

Таким образом, противоопухолевый эффект до 21 суток после ФДТ получен при всех исследуемых дозах ФС ( $1,25$ ;  $2,5 \text{ мг/кг}$ ) и параметрах лазерного облучения ( $100$ ;  $150$  и  $300 \text{ Дж/см}^2$ ;  $0,34$  и  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ ).

### Литература

1. Бурмистрова Н.В., Каплан М.А., Пономарев Г.В., Малыгина А.И. Изучение фотодинамической активности Амидоаминхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 30.
2. Гаркуша Н.Ф., Гончарова Н.Ю. Характеристика саркомы М-1 крыс // Науч. докл. высшая школа биол. науки. – 1990. – №6. – С. 154–60.
3. Гельфонд М.Л. Возможности ФДТ в онкологической практике // Физическая медицина. – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 33–7.
4. Каплан М.А., Никитина Р.Г., Малыгина А.И. Экспериментальная разработка путей оптимизации фотодинамической терапии // Лазерная и фотодинамическая терапия. Тез. докл. междунар. конф. – Обнинск, 1999. – С. 17–8.
5. Каширцева И.В., Каплан М.А., Малыгина А.И. Сравнительная оценка противоопухолевой эффективности препарата Хлоринамида-1 в различной форме при фотодинамической терапии саркомы М-1 // Материалы I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы ФД и ФДТ». Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – №1. – 2012. – С. 18–9.
6. Корчагина К.С., Гамаюнов С.В., Каров В.А. и др. Прогностическое значение параметров флюоресценции при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 100.
7. Меерович И.Г., Казачкина Н.И., Савицкий А.П. Изучение проявлений фотоиммунного отклика при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 110.
8. Меерович И.Г., Меерович Г.А., Оборотова Н.А., Барышиников А.Ю. Распределение света по глубине опухолевого очага и эффективность использования терапевтического излучения при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 93–7.
9. Отдельнова О.Б., Гельфонд М.Л., Хашиукова А.З. и др. Предклиническая оценка фотосенсибилизатора и источника света для оптимизации ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 38–9.
10. Романко Ю.С., Цыб А.Ф., Каплан М.А., Попучиев В.В. Зависимость противоопухолевой эффективности фотодинамической терапии от плотности световой энергии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 139, № 4. – С. 456–61.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К, 2012. – Часть 1. – С. 650–69.
12. Странадко Е.Ф. Основные этапы развития и современное состояние ФДТ в России // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 51.
13. Филоненко Е.Б. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 85.
14. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. Фотодинамическая терапия. – М.: Мед. информ. агентство, 2009. – 193 с.
15. Чан Тхи Хай Иен, Г.В. Раменская, Н.А. Оборотова. Фотосенсибилизаторы хлоринного ряда в фотодинамической терапии опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 99–105.
16. Kashirtseva I.V., Kaplan M.A., Ponomarev G.V., Malygina A.I. Comparative evaluation of antitumoral efficiency of preparation chlorine-amineamide-1 in a various forms for photodynamic therapy of sarcoma M-1 // Abstracts of Laser Helsinki 2012 International Congress Helsinki, Finland 24-29 August 2012. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2012. – 9(1). – S11.
17. Kashirtseva I.V., Kaplan M.A., Ponomarev G.V. et al. Comparative evaluation of antitumoral efficiency of various photosensitizers at photodynamic therapy of sarcoma M-1 // Abstracts of Laser Helsinki 2012 International Congress Helsinki, Finland 24-29 August 2012. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2012. – 9(1). – S11–S12.

Противоопухолевая эффективность ФДТ зависела от дозы ФС, плотности энергии и плотности мощности лазерного излучения. Значительный ингибирующий эффект наблюдался уже при дозе ФС  $1,25 \text{ мг/кг}$ , при плотности энергии  $150 \text{ Дж/см}^2$  и плотности мощности  $0,51 \text{ Вт/см}^2$  лазерного излучения. Полная регрессия опухоли у  $100\%$  животных до 21 суток после ФДТ отмечалась при использовании амидоаминхлорина в дозе ФС  $2,5 \text{ мг/кг}$ , при плотности энергии лазерного излучения  $300 \text{ Дж/см}^2$  и плотности мощности  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ .

### Выводы

1. Оптимальное время проведения лазерного облучения после внутрибрюшинного введения амидоаминхлорина в дозе  $2,5 \text{ мг/кг}$  наступает через 3 часа, когда индекс контрастности достигает своего максимального значения.
2. Значительный ингибирующий эффект (ТРО –  $92,5\%$  и ПР –  $50\%$ ) получен уже при внутрибрюшинном введении ФС в дозе  $1,25 \text{ мг/кг}$ , при плотности энергии  $150 \text{ Дж/см}^2$  и плотности мощности  $0,51 \text{ Вт/см}^2$  лазерного излучения.
3. Минимально эффективная доза ФС, приводящая к полной регрессии саркомы М-1 у  $100\%$  животных на 21 сутки исследования после ФДТ, при внутрибрюшинном введении амидоаминхлорина составляла  $2,5 \text{ мг/кг}$  при плотности энергии лазерного излучения  $300 \text{ Дж/см}^2$  и плотности мощности  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ .

## ТЕЗИСЫ

Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции  
с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»

*Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Н.В. Селиванова, Д.В. Кудрявцев, А.Д. Каприн*

### **УРОВЕНЬ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ**

*МРНЦ им. А.Ф. Цыба - филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск, Калужская обл.*

**Актуальность.** Оценка количества иммунорегуляторных молекул MICA (MHC class I chain-related gene A), цитокинов (FNO- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-2) и NK-клеток, в крови онкологических больных может служить отправной точкой для мониторинга развития злокачественного новообразования и эффективности терапии.

**Цель и задачи.** Сравнить уровень стресс-индуцированных молекул MICA, цитокинов и рецепторов NKG2D на NK-клетках у больных меланомой и здоровых добровольцев.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали сыворотку крови и периферическую кровь 20 больных меланомой и 60 здоровых доноров. Для определения уровня MICA, FNO- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  и IL-2 использовали иммуноферментный анализ, количество NK-клеток и экспрессию NKG2D определяли с помощью проточной цитометрии.

**Результаты.** Среднее количество циркулирующего MICA в сыворотке крови больных меланомой составило - 1948 пг/мл, что превышало в 52 раза доноров. Содержание IL-2, FNO- $\alpha$  и IFN- $\alpha$  достоверно не превышало контрольных значений. Количество NK-клеток составило 18%, что не превышало контрольных значений. Экспрессия активационного маркера NKG2D на NK-клетках у больных меланомой составила 89%, что несколько ниже, чем в контрольной группе (95%).

**Выводы.** Показано, что в периферической крови больных меланомой количество молекул MICA резко возрастает, что приводит к ингибированию активирующего рецептора NKG2D на NK-клетках и, возможно, к снижению выработки цитокинов. Данной категории больных можно назначать препараты цитокинового ряда для активации противоопухолевого иммунного ответа.

*Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, А.М. Попов, О.Б. Карякин, С.А. Иванов, А.Д. Каприн*

### **ФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ НА ЭТАПАХ ПРОВЕДЕНИЯ АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ НК-КЛЕТКАМИ**

*МРНЦ им. А.Ф. Цыба - филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск, Калужская обл.*

**Актуальность.** Адоптивная иммунотерапия (ИТ) представляет собой новую стратегию лечения больных почечно-клеточным раком (ПКР), так как данное заболевание является хорошей мишенью для изучения состояния иммунной системы.

**Цель и задачи.** Оценить субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных ПКР и маркеров активации лимфоцитов на этапах сопроводительной ИТ.

**Материалы и методы.** Фенотип В-, Т-, NKT-, NK-лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD38, CD69, CD314, CD25) оценен у больных ПКР.

**Результаты.** До лечения у больных отмечалось повышение до 13% относительного содержания Treg-клеток и снижение до 10% после ИТ. У 75% больных увеличено число NK-клеток, что говорит об активации противоопухолевой защиты. Показатель экспрессии альфа цепи рецептора IL-2 (CD25<sup>+</sup>) на лимфоцитах превышал норму и составил 22,8%, после ИТ уровень снизился до 13%. Число HLA-DR<sup>+</sup> лимфоцитов в среднем составило 19,3%, CD38<sup>+</sup> – 29,6%, а CD69<sup>+</sup> на NK-клетках – 8,4%. После ИТ число HLA-DR<sup>+</sup> лимфоцитов уменьшилось до 12,5%, CD38<sup>+</sup> увеличилось до 32%, а CD69<sup>+</sup> на NK-клетках – до 12,3%. Среднее содержание рецептора NKG2D на всех лимфоцитах составило 45,8% и после ИТ увеличилось до 51%, а на NK-клетках - 21,50% и снизилось до 15%.

**Выводы.** Для пациентов данной группы характерно повышение Treg-лимфоцитов, NK-клеток и CD25<sup>+</sup>. После проведения ИТ характерно снижение Treg-лимфоцитов и CD25<sup>+</sup>; повышение маркеров активации CD38<sup>+</sup> на лимфоцитах и CD69<sup>+</sup> на NK-клетках. Адоптивная ИТ хорошо переносится и характеризуется отсутствием побочных эффектов.

*Д.Е. Автомонов, А.А.Пароконная, Л.Н.Любченко, И.В.Паниченко, В.Н.Богатырев*  
**BRCA-АССОЦИИРОВАННЫЙ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЖЕНЩИН МОЛОДОГО ВОЗРАСТА (КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ПРОГНОЗ)**

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

**Актуальность.** Около 5 % случаев РМЖ в молодом возрасте возникает на фоне герминальных мутаций, генетической основой которых являются гены репарации BRCA1 или BRCA2. Различия в молекулярном патогенезе между BRCA-ассоциированными и спорадическими опухолями молочной железы предполагают, что эти опухоли могут различаться по фенотипическим и прогностическим признакам.

**Цель исследования.** Выявить различия в клиническом течении между больными спорадическим РМЖ и BRCA-ассоциированным РМЖ

**Материалы и методы.** Исследование основано на анализе 117 пациенток, больных РМЖ, не старше 35 лет. Всем больным было выполнено молекулярно-генетическое исследование ДНК с целью выявления герминальных мутаций в генах BRCA1 и BRCA2.

**Результаты.** Мутации в гене BRCA1 определялись у 30 пациенток, у 87 пациенток мутации в генах BRCA1/2 выявлены не были (группа контроля). При анализе было установлено, что для BRCA1-ассоциированного РМЖ характерно: высокая частота РМЖ в семейном анамнезе – 40 % наблюдений, 9 % в контрольной группе ( $p < 0,001$ ); высокая частота диагностики РМЖ на фоне беременности и лактации – 40 % наблюдений, 9,2 % в контрольной группе ( $p = 0,002$ ); преобладание инфильтративного протокового рака (77,8 %); III степень злокачественности – 56,2 %, 26,1 % в контрольной группе ( $p = 0,028$ ); тройной негативный фенотип опухоли – 61,9 %, 26,3 % в контрольной группе ( $p = 0,009$ ); высокая чувствительностью к неoadъювантной химиотерапии: III и IV степень лечебного патоморфоза отмечена в 72 % наблюдений, 18 % – в контрольной группе ( $p = 0,011$ ). Течение заболевания у больных молодого возраста с положительным BRCA1 статусом характеризуется 30 % риском возникновения контралатерального РМЖ в течении первых 5 лет наблюдения, в контрольной группе 5,7 %, ( $p = 0,004$ ). В группе BRCA1-ассоциированного РМЖ 5-летняя безрецидивная выживаемость (БВ) составила  $80,1 \pm 8,1$  %, общая выживаемость (ОВ)  $92,5 \pm 5,0$  %; в контрольной группе –  $80,2 \pm 6,1$  %,  $94,7 \pm 2,9$  %. ( $p = 0,669$  и  $p = 0,341$  соответственно).

**Заключение.** Наличие герминальной мутации BRCA1 не ухудшает показателей общей и безрецидивной 5-летней выживаемости больных РМЖ молодого возраста.

*Н.П. Акентьева*

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ RНАММ-ТАРГЕТ ПЕПТИДОВ IN VITRO**

*Институт Проблем Химической Физики РАН, Черноголовка*

**Актуальность.** Частота возникновения раковых заболеваний в мире растет в геометрической прогрессии. Несмотря на определенные успехи в лечении раковых заболеваний, основной проблемой в онкологии является отсутствие селективности противоопухолевых препаратов. Поэтому разработка способов для таргетной терапии раковых заболеваний является самой актуальной и активно развивающейся областью биомедицины.

**Задачи исследования.** Изучение терапевтического потенциала RНАММ-таргет пептидов, взаимодействующих с конкретной молекулярной мишенью в клетке – RНАММ-рецептором.

**Материалы и методы.** Для изучения влияния пептидов на метаболизм, жизнедеятельность клеток рака молочной железы (MDA-MB-231) использовался метод флуоресцентного анализа (AlamarBlue assay). Эффект пептидов на пролиферацию опухолевых клеток оценивался с помощью метода BrdU assay, позволяющего непосредственно оценить изменение синтеза ДНК в клетке. Анализ индукции апоптоза или некроза под действием пептидов проводился иммуноферментным методом (ELISA Cell detection assay). Для количественного измерения эффекта пептидов на активности каспаз-3/7 использовался Caspase-3 Colorimetric Assay (GenScript). Влияние пептидов на инвазивность раковых клеток исследовалось с помощью метода деградации флуоресцентно меченого желатина опухолевыми клетками (QCMTM Gelatin Invadopodia assay).

**Результаты.** Установлено, что RНАММ-таргет пептиды ингибировали жизнеспособность раковых клеток на 30 %, подавляли их пролиферацию. Показано, что RНАММ-таргет пептиды индуцировали апоптоз и некроз клеток рака молочной железы, стимулировали активность каспаз 3/7. Обнаружено, что RНАММ-таргет пептиды ингибировали инвазивность опухолевых клеток на 70 %.

**Выводы.** RНАММ-таргет пептиды являются перспективными противоопухолевыми реагентами.

*Е.Н. Александрова, Е.Л. Протопович, Д.А. Церковский, Ю.П. Истомин*

**КОМБИНАЦИЯ ЦИСПЛАТИНА С ФДТ IN VITRO**

*РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь*

**Цель исследования.** Изучить противоопухолевую активность цисплатина (ЦП) при комбинации с фотолоном и фотооблучением (ФО).

**Материалы и методы.** Монослой опухолевых клеток HeLa в логарифмической стадии роста инкубировали в течение 24 ч в питательной среде с  $0,05 - 0,2$  мкг/мл ЦП, затем добавляли на 3 ч  $1$  мкг/мл фотолона, отмывали холодным раствором Хенкса, добавляли свежую питательную среду и облучали лазером ( $661$  нм) в дозе  $0,25$  Дж/см<sup>2</sup>. Спустя 21 ч монослой клеток диспергировали  $0,02\%$ -ным раствором версена и проводили подсчет живых клеток в камере Горяева.

**Результаты и выводы.** Инкубация клеток с ЦП без фотолона и без ФО приводила спустя 48 ч к дозозависимому угнетению пролиферации; ЭК<sub>50</sub> для ЦП составила  $0,17$  мкг/мл. Выживаемость клеток после одного воздействия ФДТ с фотолоном составила 59% по отношению к контролю. При комбинированном воздействии ЦП, фотолона и ФО наблюдалось достоверное снижение числа клеток, по сравнению с действием одного ЦП или одного фотодинамического воздействия; ЭК<sub>50</sub> для ЦП составила  $0,05$  мкг/мл. Добавление фотолона или ФО по отдельности не влияло на эффективность ЦП. Комбинация ЦП с фотолоном и ФО приводит к выраженному противоопухолевому эффекту при сниженной концентрации ЦП.

*Ю.В. Алексеев<sup>1</sup>, А.В. Иванов<sup>2</sup>, А.С. Рябов<sup>3</sup>, Н.М. Шумилова<sup>1</sup>, И.П. Шилов<sup>3</sup>*

### **МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ И КОНТРОЛЯ ЗА ЛЕЧЕНИЕМ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КОЖЕ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧКАХ**

<sup>1</sup>ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА», Москва

<sup>2</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» Москва

<sup>3</sup>ФГБНУ «ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН, Фрязинский филиал», г. Фрязино

**Актуальность.** Как известно, иттербиевые комплексы порфиринов (ИКП) являются перспективными маркерами для флуоресцентной диагностики злокачественных опухолей без свойственной традиционным порфиринам фототоксичности при высоком флуоресцентном контрасте и селективности накопления в опухоли. Ранее нами в экспериментах *in vivo* на мышах с подкожно привитой саркомой S-37 по флуоресценции в ближнем ИК-диапазоне было показано четкое его накопление в опухолевой ткани по отношению к нормальной. Дикалиевая соль ИКП (водорастворимый препарат) вводился при этом внутривенно. Флуоресцентный контраст накопления измерялся через 48 часов.

**Цель исследования.** Разработать новые фармацевтические композиции (ФК) для наружного применения на кожу и слизистые оболочки и необходимую аппаратуру для измерения флуоресценции.

**Материалы и методы.** Больные-волонтеры с воспалительными и пролиферативными процессами. ИКП в виде гелей для наружного применения, макетный вариант лазерно-волоконного флуориметра (ЛВФ) с выделенным диапазоном измерения 900 – 1100 нм.

**Результаты.** Разработаны амфифильные ФК ИКП в виде гелей как для эпикутанного применения, так и для нанесения на слизистые оболочки (компоненты разрешены для клинического применения). Подобраны необходимые концентрации ИКП. Выявлено эффективное накопление ФК в местах патологически измененных кожи и слизистых, где установлена четкая разница интенсивности флуоресценции по сравнению со здоровыми тканями (диапазон 900 – 1100 нм). Изменение параметров флуоресценции имеет зависимость от времени измерения и характера протекания патологического процесса.

**Выводы.** Впервые предлагается метод диагностики и контроля за лечением с наружным применением ИКП. По предварительным данным метод может быть успешно применен в дерматологии, стоматологии, гинекологии и других областях медицины; отличается простотой и информативностью.

*А.С. Антипова, О.Ю. Барацова, М.А. Френкель, Н.Н. Тулицын*

### **ТЕРАПИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ СО СМЕШАННЫМ ФЕНОТИПОМ (СФОЛ)**

ФГБНУ «РОИЦ имени Н.Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** Острые лейкозы со смешанным фенотипом (СФОЛ) редки и составляют всего 3 % от всех острых лейкозов.

**Материалы и методы.** В исследованную группу вошли 13 больных ОЛ, из них у 11 определялся миелоидно/В-лимфоидный фенотип бластов, у 2 – миелоидно/Т-лимфоидный.

**Результаты.** В 8 из 9 обследованных случаев выявлялись прогностически неблагоприятная t(9;22)(q34;q11) и/или химерный ген BCR/ABL. Вариант лечения определялся молекулярно-цитогенетическим профилем заболевания. Больные Ph+ СФОЛ получали иматиниб (ИТК) в комбинации со схемами химиотерапии, принятыми для ОЛЛ (n=8). При отсутствии Ph-хромосомы, а также у необследованных пациентов были приняты схемы терапии, разработанные только для ОМЛ или для ОМЛ и ОЛЛ (n=4). В целом в группе отмечалась высокая непосредственная эффективность: частота ПР – 83,3 % и низкая ранняя летальность – 8,3 %. У всех пациентов Ph+СФОЛ была констатирована ПР. Однако отдаленные результаты были неудовлетворительны, в группе Ph+СФОЛ 3-х летняя ОВ составила 61 % (медиана 36 мес), у остальных – 0 %, (медиана 10 мес.).

**Выводы.** Таким образом, комплексная характеристика варианта острого лейкоза с включением иммунофенотипических и молекулярно-цитогенетических данных позволяет выбрать адекватную схему лечения больных ОЛ. При Ph позитивном варианте обязательным компонентом терапии должны быть ИТК 1 или 2 поколений в комбинации со схемами лечения ОЛЛ. Проблема лечения больных Ph-СФОЛ остается нерешенной.

*Т.П. Артемьева, Ю.П. Истомин, Д.А. Церковский*

### **ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ ФОТОЛОН ЛЕЙКОПЛАКИИ ВУЛЬВЫ**

РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

**Цель исследования.** Оценка эффективности и безопасности фотодинамической терапии (ФДТ) как органосохраняющего метода у пациенток с лейкоплакией вульвы и перианальной области.

**Материалы и методы.** Методом ФДТ было пролечено 13 женщин (42 очага) в возрасте от 23 до 78 лет (49,2±16,2 года). Фотосенсибилизатор фотолон (РУП «Белмедпрепараты», РБ) вводили внутривенно в дозе 2,0 мг/кг. Фотооблучение очагов осуществляли через 2,5 – 3 ч после инфузии ФС на полупроводниковом лазере «УПЛ ФДТ» («ЛЕМТ», РБ, λ=661 нм) в экспозиционных дозах света 50 и 100 Дж/см<sup>2</sup> на одно поле. Плотность мощности – 170 мВт/см<sup>2</sup>; мощность – 0,3±10% Вт и время облучения – от 10 до 30 минут. Лечение осуществляли под медикаментозным обезболиванием. Метод оценки результатов – клинический.

**Результаты и выводы.** Контрольное обследование проводилось через 1 и 3 месяца после ФДТ. Во всех случаях отмечена полная регрессия пролеченных очагов. Краевая эпителизация начиналась на 8 – 11 сутки и завершалась через 3 – 6 недель. Осложнений и побочных эффектов зарегистрировано не было. Пациентки находятся под динамическим наблюдением в сроки от 1 до 26 месяцев и в связи с распространенностью процесса продолжают лечение. Полученные результаты позволяют судить о возможности применения ФДТ в лечении данной патологии.

*Д.А. Афанасьева, А.А. Рудакова, О.С. Бутова, Л.Ф. Морозова, А.П. Полозкова, М.А. Барышникова*  
**ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АРАНОЗЫ НА КЛЕТОЧНУЮ ГИБЕЛЬ**  
ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** В предыдущих работах было обнаружено, что липосомальная лекарственная форма аранозы вызывает гибель опухолевых клеток, устойчивых к «Аранозе лиофилизату для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио).

**Цель исследования.** Изучение механизма гибели клеток меланомы, вызванной аранозой-лио и липосомальной аранозой.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на клеточных линиях метастатической меланомы человека mel Kog и mel Mtp-X. Клетки 24 ч инкубировали с лекарственными формами аранозы – аранозой-лио и липосомальной. Методом двойного окрашивания аннексином, меченым FITC и пропидием йодидом определяли наличие апоптотической гибели клеток. Определение активной каспазы-3 проводили в реакции иммунофлуоресценции с антителами к каспазе-3, мечеными FITC.

**Результаты и выводы.** Методом двойного окрашивания было показано, что клетки линии mel Kog после 24 ч инкубации с аранозой-лио и липосомальной аранозой погибали по механизму апоптоза. На клетки mel Mtp-X оказывала действие только липосомальная араноза, клетки гибли также по механизму апоптоза, но к аранозе-лио эта клеточная линия была устойчива. При определении в клетках mel Kog и mel Mtp-X уровня активной эффекторной каспазы-3, было обнаружено, что уровень данного фермента под влиянием лекарственных форм аранозы повышался только в клетках mel Kog на 35 % в случае аранозы-лио и на 41 % при действии липосомальной формы. В клетках mel Mtp-X каспаза-3 после воздействия обеих лекарственных форм аранозы оставалась на уровне контроля (около 1 %). Вероятно, гибель клеток mel Mtp-X под влиянием липосомальной аранозы происходит через активацию митохондриального каспаза-независимого пути апоптоза.

*А.Н. Балаев, В.Н. Осипов, К.А. Охманович*  
**ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА 1-3 ФРАГМЕНТА**  
**СИНТЕТИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ ГОНАДОЛИБЕРИНА**

ЗАО «Фарм-Синтез», Москва, Россия

**Задачи исследования.** Разработка и оптимизация жидкофазного метода синтеза трипептида Pyy-His-TrpOH пригодного для использования в технологическом масштабе при производстве синтетических агонистов гонадолиберина.

**Материалы и методы.** В настоящее время синтетические агонисты гонадолиберина (бусерелин, гозерелин, лейпрорелин и трипторелин) широко используются при лечении прогрессирующего рака предстательной железы, рака молочной железы, фибромиомы матки, эндометриозе и т.д. Известные методы синтеза Pyy-His-TrpOH имеют ряд существенных недостатков: большое количество стадий (за счёт стадий постановки и снятия защитных групп), высокая себестоимость процесса, использование токсичных реагентов (бензилоксикарбонилхлорид, гидразин гидрат, трет-бутилнитрит), жёсткие условия проведения процесса (при проведении конденсации азидным методом). Устранение этих недостатков позволило бы не только существенно повысить эффективность и безопасность производства, но значительно уменьшить себестоимость конечного продукта.

**Результаты.** Разработанный новый 4-стадийный жидкофазный метод синтеза трипептида с использованием в качестве исходных реагентов пироглутаминовую кислоту, гистидин и гидрохлорид метилового эфира триптофана исключает токсичные и дорогостоящие реагенты и не предусматривает стадий постановки и снятия защитных групп. Разработанная и оптимизированная схема синтеза позволяет легко масштабировать процесс и получать целевое вещество с чистотой более 98 % без использования методов хроматографической очистки.

**Выводы.** В результате проделанной работы разработан и внедряется в производство (синтез бусерелина и лейпрорелина в ЗАО «Фарм-Синтез») новый легко масштабируемый, технологически приемлемый, жидкофазный способ синтеза Pyy-His-TrpOH. Внедряемый метод позволяет получать целевой трипептид с общим выходом (по 4 стадиям) 40 – 43 % и содержанием основного вещества (по стандартному образцу) более 98 %.

*М.А. Барышницова<sup>1,2</sup>, Д.А. Афанасьева<sup>1,2</sup>, А.А. Осипова<sup>1,2</sup>, В.Н.Осипов<sup>1,2</sup>, К.Р. Матевосян<sup>2</sup>, А.В. Колотаев<sup>2</sup>, С.Ю. Фролова<sup>2</sup>, Д.С. Хачатрян<sup>2</sup>*

### ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>ФГБП «ИРЕА», Москва

**Цель исследования.** Оценка *in vitro* противоопухолевой активности новых соединений производных пурина, пиридопиримидина – аналога ацикловира, пиримидопиримидина, а также некоторых производных куркумина, синтезированных в ИРЕА.

**Материалы и методы.** Для оценки противоопухолевой активности использовали МТТ-тест. Исследование проводили на клеточных линиях опухолей человека: карцинома толстой кишки НСТ-116; карцинома простаты LNCap; карцинома простаты РС-3; карцинома легкого А549; аденокарцинома молочной железы MCF-7; диссеминированная меланома Mel Kor; диссеминированная меланома Malmt-3m, Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, полученных из Банка клеточных линий ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина». Активными считали соединения, у которых ИК50 (ингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50% клеток) была равна или меньше 100 мкМ.

**Результаты.** Было протестировано 137 новых соединений, из них 64 проявили противоопухолевую активность в концентрации 100 мкМ. На всех клеточных линиях, используемых в исследовании, были активны 17 соединений в концентрации 100 мкМ, остальные проявили избирательную активность. Однако, в меньших концентрациях большинство соединений были не эффективны. Только 17 соединений сохранили эффективность в концентрации 10 мкМ: der-02789, der-01330, der-01643, D51, D89, D95, D10702, D1701, KOAd6-2, KOA137, KOA138, KOA139, AM3Pt, A342a, det0007, d04605 и d04607. Соединения D89, D95, KOAd6-2 были активны на клетках Jurkat, Malme-3m, MCF-7 и РС-3. Соединение A341a – на Jurkat, A549 и НСТ-116. Вещество der-01643 активно в отношении клеточных линий MCF-7 и Mel Kor, KOA-139 – Jurkat и MCF-7, det0007 – A549 и РС-3. Соединение der-01330 было активно на клетках меланомы человека, соединение der-02789 – на LNCap, соединение D51 – на Jurkat, соединения D1701 и AM3Pt – на РС-3, KOA137 и KOA138 – на клетках MCF-7, а d04605 и D10702 – на клетках толстой кишки НСТ-116. Соединение d04607 оказывало противоопухолевое действие в концентрации 10 мкМ на все используемые в исследовании клеточные линии, и его можно считать наиболее активным.

**Заключение.** Соединения, у которых обнаружена противоопухолевая активность *in vitro*, будут исследованы для подтверждения противоопухолевого эффекта на перевиваемых опухолях экспериментальных животных *in vivo* и далее будут предложены для доклинических исследований с целью создания новых противоопухолевых препаратов.

*О.А. Безбородова<sup>1</sup>, Е.Р. Немцова<sup>1</sup>, Ю.Б. Венедиктова<sup>1</sup>, И.В. Алексеенко<sup>2</sup>, Г.С. Монастырская<sup>2</sup>, Р.И. Якубовская<sup>1</sup>, Е.Д. Свердлов<sup>2</sup>, А.Д. Каприн<sup>1</sup>*

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ СУИЦИДНОЙ ТЕРАПИИ

<sup>1</sup>ФГБУ «ФМИЦ им. П.А.Герцена» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>ФГБУН «ИВХ» РАН, Москва

**Актуальность.** Разработаны две генно-терапевтические конструкции, несущие под контролем цитомегаловирусного промотора (CMV) гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVtk) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора мыши (mGM-CSF – модельная конструкция) или человека (hGM-CSF – фармакопейная конструкция) с невирусной системой доставки (CMV-HSVtk-GM-CSF-PPT). На аллогraftных моделях показано, что модельная конструкция обладает противоопухолевой активностью, а выраженность эффекта уменьшается в ряду: саркома S37>>аденокарцинома толстой кишки C26>рак шейки матки PШМ-5>меланома В16>карцинома легкого Льюис LLC.

**Цель исследования.** Оценка противоопухолевого действия конструкции CMV-HSVtk-hGM-CSF-PPT на ксенотрансплантатах опухолей человека.

**Материалы и методы.** Система «CMV-HSVtk-hGM-CSF-PPT+Гц». Мыши BALB/nude с ксеногraftами опухолей человека: аденокарциномы толстой кишки HT29, рака шейки матки HeLa, карцином KB и HEp-2; начало лечения – 10 – 14 сутки роста опухоли ( $V \approx 100 \text{ мм}^3$ ). Критерии оценки эффективности: торможение роста опухоли (ТРО) и увеличение продолжительности жизни животных (УПЖ).

**Результаты.** Показано, что через 2 – 4 недели после окончания лечения эффективность составила на моделях: HT29 – ТРО 75 %, УПЖ 22 %; KB – ТРО 61 – 66 %; HeLa – ТРО 51 – 57 %, УПЖ 27 %; HEp2 – ТРО 46 – 50 %, УПЖ=14 %.

**Вывод.** Выявлена чувствительность опухолей человека к системе «CMV-HSVtk-hGM-CSF-PPT+Гц», которая уменьшается в ряду HT29>KB>HeLa>HEp2. Показан сходный противоопухолевый эффект в отношении опухолей человека и мыши одинакового органного происхождения: HT29 – C26 и HeLa – PШМ-5.

*Ю.А. Белый, А.В. Терещенко, Ю.А. Сидорова*

### ЛЕЧЕНИЕ АНГИОМАТОЗА СЕТЧАТКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНТРАОКУЛЯРНОЙ ФТД

*Калужский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» МЗ РФ, Калуга*

**Цель работы.** Разработка методики интраокулярной фотодинамической терапии (иФДТ) для лечения ангиоматоза сетчатки.

**Материалы и методы.** иФДТ проведена пациенту в возрасте 23 года с диагнозом: синдром Гиппель-Линдау. Размер проминенции ангиоматозного узла составлял 3,3 мм. Техника операции: за 30 минут до начала операции внутривенно капельно вводили 50 % от стандартной дозы фотосенсибилизатора (ФС) «Фотолон» в течение 10 минут, а после витрэктомии, удаления эпиретинальных мембран и фиброваскулярной ткани давление воздуха снижали до 18 – 20 мм. рт. ст. и внутривенно вводили оставшиеся 50 % дозы ФС, через 10 минут осуществляли интраокулярное лазерное облучение ангиомы сетчатки с длиной волны  $662 \pm 2$  нм, полями 3,5 – 4,0 мм с перекрытием: сначала облучали участок с питающими сосудами ( $250 - 300$  Дж/см<sup>2</sup>), затем – верхушку ангиоматозного узла ( $100$  Дж/см<sup>2</sup>), а далее – основание по кругу с захватом 1,5 – 2,0 мм от видимой границы новообразования ( $50$  Дж/см<sup>2</sup>).

**Результаты.** Через 3 месяца острота зрения составила 0,2 н/к, проминенция ангиоматозного узла уменьшилась до 1,2 мм без сохранения активности процесса, к 6 месяцам – до 0,8 мм.

**Заключение.** Разработанная методика является перспективной и позволяет достичь положительного клинического эффекта. Необходимо проведение дальнейших исследований в клинической группе с большим количеством пациентов.

*Л.З. Болиева<sup>1</sup>, Ю.М. Букреев<sup>2</sup>, С.Г. Галачиев<sup>1</sup>, И.М. Лученко<sup>2</sup>, А.В. Погобало<sup>3</sup>, В.В. Решетникова<sup>1</sup>, А.В. Сергеев<sup>1</sup>*

### КОРРЕКЦИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИРОДНЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ И АНТИОКСИДАНТАМИ

<sup>1</sup>Северо-Осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ

<sup>2</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>3</sup>ГОСУДАРСТВЕННАЯ КЛАССИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМ. МАЙМОМИДА, МОСКВА

**Актуальность.** Хроническая свинцовая интоксикация (ХСИ) в настоящее время рассматривается как существенный фактор риска возникновения злокачественных новообразований.

**Цель исследования.** Выяснение возможной роли полисахаридов (ПС) и антиоксидантов (АО) в коррекции симптомов ХСИ.

**Материалы и методы.** ХСИ индуцировали у крыс линии Вистар и мышей BALB/c систематическим введением с кормом ацетата свинца (СВ) в дозе 25 мг/кг в течение 12 – 14 месяцев. ПС сабельника болотного, препараты бета-каротина (БК), БК-содержащего препарата «Каскатол» (КСК) и корня солодки давали ежедневно в течение всего эксперимента. Содержание СВ в плазме крови и тканях животных определяли с помощью хроматомасс-спектрометрии. Симптомы ХСИ регистрировали ежеквартально.

**Результаты.** Включение ПС и АО в рацион животных с ХСИ приводило к снижению накопления СВ на 20 – 30 % в плазме крови, в костной ткани, в тканях печени и почек. ПС и АО уменьшали на 25 – 45 % симптомы ХСИ, что проявлялось в торможении потери веса, увеличении продолжительности жизни животных, ослаблении симптомов анемии. ПС и АО тормозили в 1,5 – 2 раза симптомы иммунодепрессии, что проявлялось в увеличении пролиферативной активности спленоцитов и усилении цитотоксической активности Т-киллеров и перитониальных макрофагов. ПС и АО ослабляли прооксидантное действие АС, которое выражалось в снижении концентрации малонового диальдегида, повышении активности супероксиддисмутазы.

**Выводы.** ПС и АО могут рассматриваться в качестве перспективных потенциальных средств химиопрофилактики рака (Cancer chemoprevention).

*Е.И. Борисенко<sup>1</sup>, О.В. Кочеткова<sup>2</sup>, И.В. Шапошникова<sup>1</sup>, Ю.Н. Потапов<sup>2</sup>*

### ПРИЗНАКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И HER2-НЕГАТИВНЫХ АДЕНОКАРЦИНОМАХ ЖЕЛУДКА

<sup>1</sup>БУЗ ВО «ВОПАБ»; <sup>2</sup>БУЗ ВО «ВОКОД», Воронеж

**Цель исследования.** Изучить особенности роста аденокарцином желудка в зависимости от HER2 статуса новообразования.

**Задачи.** Исследовать пролиферацию, метастатический потенциал опухолевых клеток.

**Материалы и методы.** Злокачественные новообразования желудка у 231 больного с I – III стадиями процесса. HER2 статус исследовали стандартно. Пролиферативную активность клеток оценивали по индексу Ki67, апоптоз – по количеству опухолевых клеток с гиперэкспрессией белка mt p53, адгезивную способность – по уровню экспрессии E-кадгерина.

**Результаты.** В HER2(+) опухолях средний Ki67 был  $71,0\% \pm 4,3\%$ , в HER2(–) –  $81,5\% \pm 3,5\%$  ( $p < 0,1$ ). Экспрессия mt p53 имела в 60 % HER2(+) и 40 % HER2(–) опухолях. Яркая экспрессия E-кадгерина была в 61 % клеток HER2(+) и 43 % HER2(–).

**Заключение.** В HER2-положительных опухолях интенсивность пролиферации, способность к p53-зависимому апоптозу, метастатический потенциал ниже, чем в HER2-негативных. Таким образом, имеет место зависимость степени злокачественности опухолевых клеток от HER2 статуса аденокарцином желудка.

*Т.Г. Боровская, С.И. Камалова, А.В. Вычужанина, М.Е. Полуэктова, В.А. Григорьева, Н.Б. Кривова, В.Е. Гольдберг*

### **ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦИТИНА НА МОРФОЛОГИЮ И АНТИОКСИДАНТНО-ПРООКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС СПЕРМАТОЗОИДОВ КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ ПАКЛИТАКСЕЛ**

*«НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга», Томский НИИ онкологии, Томск*

**Актуальность.** Восстановление фертильности пациентов, получавших цитостатические препараты, является актуальным. Для снижения их токсичности на сперматогенный эпителий обоснованным является использование антиоксидантов. Применяемый антиоксидант должен быть показан для онкологического больного. К препаратам такого плана относится дегидрохверцитин (ДГК).

**Целью** работы явилось изучение влияния ДГК на морфологию и анти-/прооксидантный баланс сперматозоидов крыс, получавших паклитаксел (П).

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 15 аутбредных сток CD крысах-самцах. 5 крыс опытной группы получали ДГК течение 5 дней до и 5 дней после введения П. Через 3 мес. после начала опыта определялось общее количество сперматозоидов на эпидидимис (ОКС), количество их подвижных форм (КПФ), и анти-/прооксидантную активность гомогената эпидидимиса.

**Результаты.** Установлено, что при введении одного П. достоверно снижались ОКС и КПФ, анти-/прооксидантный баланс. На фоне введения ДГК, ОКС не отличалось от фоновых значений, КПФ спермиев имел тенденцию к возрастанию, анти-/прооксидантный баланс нормализовался.

**Выводы.** ДГК может быть использован для снижения токсичности паклитаксела на репродуктивный статус.

*Е.В. Бочаров, Р.В. Карпова, О.А. Бочарова, И.В. Казеев, М.В. Уткина*

### **УСИЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ LFA-1 И MAC-1 ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА ФИТОАДАПТОГЕНА НА МОДЕЛИ СПОНТАННОГО ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗА**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

*ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва*

**Цель работы.** Исследование экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a) и Mac-1 (CD11b) у мышей-самцов инбредной линии СВА с высокой частотой спонтанного гепатоканцерогенеза в раннем и зрелом онтогенезе при профилактическом воздействии сухого экстракта фитоадаптогена.

**Материалы и методы.** Стандартизованный сухой экстракт на основе фитоадаптогена, включающего компоненты 40 растительных экстрактов, обладающего иммуномодулирующим, интерферогенным, антимутагенным, антиоксидантным, радиопротекторным эффектами; 200 мышей-самцов линии СВА (сублиния СВА/Lac Y), у которых после 18 мес. в 100 % случаев выявляются гепатокарциномы. Контрольные мыши получали в качестве питья воду; опытные мыши – 0,3% раствор сухого экстракта фитоадаптогена в течение 1-го месяца постнатального развития, захватывая период, соответствующий завершению дифференцировки нормальной ткани печени. Экспрессию CD11a и CD11b антигенов определяли в возрасте 4, 8, 22 месяцев методом проточной цитофлуориметрии.

**Результаты.** В возрасте 4 и 8 месяцев у мышей обеих групп уровень экспрессии CD11a и CD11b антигенов статистически не различался ( $p \geq 0,5$ ). У контрольных мышей к 22 месячному возрасту выявлено достоверное снижение экспрессии CD11a антигена с  $45,9 \pm 3,4$  (в 8-месячном возрасте) до  $36,5 \pm 1,9\%$  ( $p_{8-22}=0,03$ ) и CD11b антигена – с  $12,1 \pm 1,7\%$  до  $6,8 \pm 1,1\%$  ( $p_{8-22}=0,02$ ). Это может приводить к недостаточному образованию конъюгатов иммунцитов с опухолевыми клетками-мишенями, что в том числе способствует ускользанию опухоли от иммунологического надзора. У опытных мышей с 8 до 22 мес. отмечена стабилизация показателей ( $p_{8-22}=0,2$  для CD11a антигена и  $p_{8-22}=0,06$  для CD11b антигена). Вместе с тем, в опытной группе экспрессия CD11a ( $44,6 \pm 2,1\%$ ) и CD11b ( $12,1 \pm 1,1\%$ ) антигенов в позднем онтогенезе была достоверно выше относительно значений контрольных мышей.

**Выводы.** Контррецепторами LFA-1 являются молекулы межклеточной адгезии ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 (которые могут находиться на опухолевых клетках), Mac-1 экспрессируется на нейтрофилах, лимфоцитах и НК-клетках, являясь лигандом в том числе ICAM-1. В связи с этим усиление экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a) и Mac-1 (CD11b) под воздействием фитоадаптогена в ранний постнатальный период может способствовать более высокой иммунореактивности животных в осуществлении киллинга клеток-мишеней эффекторами иммунитета (НК-клетками, цитотоксическими лимфоцитами).



Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, Р.В. Карпова, И.В. Казеев, М.В. Уткина

**СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ ИЛ-6 И ИЛ-10 У МЫШЕЙ  
НА МОДЕЛИ СПОНТАННОГО ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗА  
ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА ФИТОАДАПТОГЕНА**

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

**Цель и задачи.** Оценка сыровоточного уровня интерлейкинов 6 (ИЛ-6) и 10 (ИЛ-10) у мышей линии СВА в онтогенезе при профилактическом применении сухого экстракта фитоадаптогена.

**Материалы и методы.** Стандартизованный сухой экстракт на основе фитоадаптогена, включающего компоненты 40 растительных экстрактов и обладающего иммуномодулирующим, интерферогенным, антимутагенным, антиоксидантным, радиопротекторным эффектами; 200 мышей-самцов высокоракетной линии СВА (суб-линия СВА/Лас Y), у которых в возрасте после 18 мес в 100% случаев выявляются гепатокарциномы. Контрольные мыши получали в качестве питья воду; опытные мыши - 0,3% раствор сухого экстракта в течение 1-го месяца постнатального развития, захватывая период, соответствующий завершению дифференцировки нормальной ткани печени. Уровень ИЛ-6 и ИЛ-10 определяли в возрасте 4, 8, 22 месяцев с использованием иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови у мышей контрольной и опытной групп не различалась в возрасте 4 и 8 месяцев. В возрасте 22 месяцев уровень ИЛ-6 в обеих группах статистически достоверно повысился по сравнению с ранним онтогенезом. Вместе с тем у мышей опытной группы концентрация ИЛ-6 статистически достоверно была ниже, чем у контрольных животных ( $117,0 \pm 7,2$  пг/мл и  $140,2 \pm 7,2$  пг/мл соответственно,  $p=0,03$ ). Уровень ИЛ-10 в сыворотке крови контрольных мышей статистически достоверно повысился к 22 месячному возрасту до  $65,0 \pm 4,1$  пг/мл по сравнению со значениями в более ранние временные периоды. У опытных мышей в позднем онтогенезе этот показатель достоверно увеличился по своей группе до  $50,3 \pm 4,7$  пг/мл, но был значимо ниже значения у контрольных мышей ( $p=0,03$ ).

**Выводы.** Снижение выработки ИЛ-6 под воздействием сухого экстракта фитоадаптогена может приводить к подавлению образования антител против антигенов опухолевых клеток, повышая вероятность их разрушения эффекторами иммунитета, а также препятствовать расщеплению мышечных белков, замедляя развитие кахексии животных; снижение сыровоточного уровня ИЛ-10 свидетельствует о восстановлении иммунореактивности в отношении опухолевых клеток, в том числе в связи с повышением продукции интерферона  $\gamma$ . Эти процессы существенны для реализации противоопухолевых реакций.

С.С. Брусев<sup>1</sup>, Е.Ю. Щепелина<sup>1</sup>, Ю.С. Колоскова<sup>2</sup>, И.Г. Тиганова<sup>2</sup>, Ю.М. Романова<sup>2</sup>,

Г.А. Меерович<sup>3</sup>, А.Ф. Миронов<sup>1</sup>, М.А. Грин<sup>1</sup>

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ STAPHYLOCOCCUS AUREUS  
И PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

**С ПОМОЩЬЮ КАТИОННЫХ ЦИКЛОИМИДОВ ПРИРОДНЫХ ХЛОРИНОВ**

<sup>1</sup>МИТХТ имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва

<sup>3</sup>ИОФ имени А.М. Прохорова РАН, Москва

В настоящее время активно развивается метод фотодинамической антимикробной терапии, основанный на инактивации вирусов, бактерий, дрожжевых грибов и простейших активными формами кислорода, которые генерируются фотосенсибилизаторами в возбужденном состоянии.

Анализ имеющихся литературных данных показывает, что вышеназванный метод значительно отстает по уровню фундаментальной разработки и практического внедрения от противоопухолевой фотодинамической терапии, поэтому его разработка весьма актуальна. Изучение структурно-функциональных особенностей ФС показало, что незаряженные (нейтральные) молекулы ФС активно связываются с грамположительными бактериями и при воздействии света инактивируют их, тогда как фотоинаktivация грамотрицательных бактерий достигается с помощью катионных пигментов.

В ходе данной работы было показано, что предлагаемые нами новые катионные фотосенсибилизаторы на основе метиловых эфиров  $13^3$ -N-(N-метилникотинил) пурпурин- и бактериопурпуринимидов, поглощающие при 706 и 830 нм соответственно, способны успешно инактивировать планктонные клетки и биопленки грамположительных *Staphylococcus aureus* 15 и грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa* 32 бактерий.

Изучено влияние возрастающих концентраций ФС, доз и времени облучения на выживание клеток патогенов. Показано, что бактерицидный эффект катионных ФС выше на планктонных культурах по сравнению с биопленками. Оценено влияние способов разрушения биопленок (озвучивание или обработка ДНКазой) перед облучением на эффективность их фотоинаktivации.

В данном исследовании реализован синтез новых ФС на основе природных хлоринов, содержащих различное число положительно заряженных групп, полученных кватернизацией атомов азота в остатках молекул полиаминов.

*И.С. Брюховецкий, П.В. Миценко, Е.В. Толок, Р.Ю. Хотимченко, С.В. Зайцев, А.С. Брюховецкий*

### СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ С ИНДУЦИРОВАННЫМ АПОПТОЗОМ ПОДАВЛЯЮТ РОСТ КЛЕТОК ГЛИОМЫ *IN VITRO*, НО ЗАПУСКАЮТ НОВЫЙ МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК

<sup>1</sup>ФГАОУ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

**Актуальность.** Правильный выбор вектора модификации аутологических стволовых клеток является стратегически важной задачей при создании новых противораковых клеточных препаратов.

**Цель работы.** Изучение возможности стволовых клеток с индуцированным апоптозом эффективно подавлять рост и вызывать гибель опухолевых клеток *in vitro*.

**Материалы и методы.** В работе использовали культуру клеток глиомы С6 и препарат гемопоэтических CD 45+ CD34+ стволовых клеток человека предобработанных дексаметазоном. Культивирование проводили в автоматическом режиме с использованием аппарата CellIQ. Для визуального контроля применялась система глупобого оптического имиджинга биоматериалов FluoView FV 1200MPE (Olympus).

**Результаты и выводы.** Доказано, что гемопоэтические стволовые клетки с индуцированным апоптозом достоверно подавляют рост клеток глиомы при совместном культивировании в соотношении 1:1 и 1:2. В ходе эксперимента в клетках глиомы происходит накопление флуоресцентного красителя, изначально связанного с белками цитоплазмы стволовых клеток. Мы предполагаем, что данный феномен может быть вызван обменом белковыми молекулами, либо слиянием взаимодействующих клеток и лежит в основе образования новых стволовых клеток глиальной опухоли.

*О.С. Брюшнина, Р.В. Гурто*

### РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ИМАТИНИБ В ПЛАЗМЕ КВОВИ ЖИВОТНЫХ

*НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томск*

**Цель работы.** Разработка и валидация методики количественного определения противоопухолевого препарата иматиниб (ИМТ) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектором (UV) в плазме крови животных.

**Материалы и методы.** Исследование было проведено с использованием аналитического комплекса Shimadzu Prominence. Состав хроматографической системы: Насос высокого давления с двойным микроплунжерным механизмом для подачи подвижной фазы Shimadzu LC-20AD, автоинжектор ShimadzuSIL-20A с механизмом прямого ввода проб, детектор спектрофотометрический с диодной матрицей с термостатируемой проточной ячейкой SPD-M20A, термостат колонок Shimadzu CTO-20A, колонка аналитическая ProntoSIL – 120-5-C18 AQ 2×75мм с предколоночным картриджем.

**Результаты.** Для определения концентрации ИМТ в ЭДТА К2 плазме животных (кролики), полученные образцы размораживали при комнатной температуре. В пробирку типа эппендорф с герметичной крышкой объемом 5 мл помещали 1000 мкл плазмы, добавляли 1000 мкл этилацетата и тщательно перемешивали в течение 3 минут, после этого пробирки центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут. Органическую фазу отбирали в чистые пробирки и добавляли 500 мкл водного раствора муравьиной кислоты (0,2%) с pH=2,5, после чего интенсивно встряхивали в течение 3 минут. Разделение фаз осуществляли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут. Нижнюю водную фракцию отбирали, фильтровали с помощью фильтров типа Millipore с диаметром пор 0,22 мкм, аликвоту 20 мкл использовали для хроматографического анализа. Количественное определение проводили методом соотношения площадей пиков. Метод демонстрирует приемлемую производительность и является пригодным для определения ИМТ в ЭДТА К2 плазме животных в диапазоне от 50 до 2000 нг/мл. Коэффициент детерминации (r<sup>2</sup>) составлял ≥0,991. Были проанализированы внутрисерийная и межсерийная точность и сходимоссть для образцов на нижнем пределе количественного определения, с низкой, средней и высокой концентрацией, они находились в пределах 98 – 102%.

**Выводы.** Разработан и валидирован ВЭЖХ-UV метод оценки концентрации ИМТ в плазме крови животных, который может быть использован для проведения терапевтического лекарственного мониторинга и исследования биоэквивалентности противоопухолевого препарата иматиниб.

### *А.Б. Бучарская<sup>1</sup>, Н.И. Дихт<sup>1</sup>, Г.Н. Маслякова<sup>1</sup>, Г.С. Терентюк<sup>1</sup>, Н.А. Наволокин<sup>1</sup>, Б.Н. Хлебцов<sup>2</sup>, Н.Г. Хлебцов<sup>2</sup>* МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ И ПЕРЕВИТЫМ РАКОМ ПЕЧЕНИ ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ ЗОЛОТЫХ НАНОСТЕРЖНЕЙ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им.В.И.Разумовского Минздрава России,

<sup>2</sup>ИБФРМ РАН, Саратов

**Цель исследования.** Изучить морфологические изменения во внутренних органах при внутривенном введении золотых наностержней у крыс с сочетанной патологией – аллоксановым диабетом и перевитым раком печени.

**Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 48 белых крысах-самцах. Группы животных: контрольная; с диабетом; с перевитым раком РС-1; с сочетанной патологией. Экспериментальный диабет вызывали однократным внутримышечным введением аллоксана моногидрата – 100 мг/кг. Во всех группах крысам однократно внутривенно вводили по 2 мл золотых наностержней (ЗНС), концентрация золота 400 мкг/мл, синтезированных в ИБФРМ РАН. Через сутки забирали: поджелудочную железу, почки, печень, опухоль и проводили морфологическое исследование с использованием стандартных методов окраски и ШИК-реакции.

**Результаты.** При сочетанной патологии наблюдали нормализацию гликемии, снижение темпов роста опухоли, увеличение некрозов и уменьшение митозов. Через 24 ч после внутривенного введения ЗНС морфологических изменений во внутренних органах и перевитой опухоли печени в экспериментальных группах не выявлено.

**Выводы.** Внутривенное введение ЗНС через сутки не вызывает морфологических изменений во внутренних органах у крыс с перевитым раком и сочетанной патологией, что свидетельствует о перспективности их применения для решения задач экспериментальной и клинической онкологии.

*Т.С. Быркина, А.В. Колаева, Н.Д. Олтаржевская*

### **ПОДБОР КОНСЕРВАНТА ДЛЯ АЛЬГИНАТНОЙ ГИДРОГЕЛЕВОЙ КОМПОЗИЦИИ**

*ООО «КОЛТЕКС», Москва, Россия*

**Актуальность.** В ходе научных разработок, проводимых компанией «Колетекс», созданы стерильные медицинские изделия «Колегель» с уникальными свойствами: пролонгированное действие, целенаправленная доставка лекарственного вещества к очагу поражения, и представляющие собой вязкие композиции на основе альгината натрия, с введенными в них различными лекарственными веществами.

**Цель исследования.** Высокая обсеменяемость альгината натрия и, как следствие, изготавливаемых из него изделий до стадии радиационной стерилизации, является основной проблемой, возникающей при производстве данной продукции марки «Колегель». Таким образом, главной целью является разработка способов уменьшения микробной обсемененности данной продукции до финишной радиационной стерилизации.

**Задачи.** Подбор консервирующей добавки, которая в сочетании с финишной радиационной стерилизацией дозой, установленной в техническом регламенте, обеспечивала бы стерильность данной композиции.

**Материалы и методы.** Нами были выбраны следующие консервирующие добавки: DS 4 (4% сорбиновой кислоты, заключенной в мицеллы), DS 12 (12% бензойной кислоты, заключенной в мицеллы), DS 44 (4% сорбиновой кислоты и 4% бензойной кислоты, заключенных в мицеллы), сорбат калия, бензойная кислота, смесь сорбата калия и бензойной кислоты.

**Результаты.** По итогам экспериментов установлено, что добавление в гидрогелевую композицию на основе альгината натрия сорбата калия в концентрации 0,25% масс. в сочетании с гамма-стерилизацией дозой 6 кГр обеспечивает стерильность данной композиции, а также препятствует снижению ее вязкости после финишной стерилизации. Гамма-стерилизация альгинатной гидрогелевой композиции с добавлением 0,25% сорбата калия дозой 15 кГр также обеспечивает ее стерильность, а вязкость удовлетворяет требованиям технического регламента предприятия. Необходимо отметить, что стерильность гидрогелевой композиции на основе альгината натрия в сочетании с радиационной стерилизацией также обеспечила смесь 0,15% сорбата калия и 0,15% бензойной кислоты.

**Вывод.** Установлено, что сорбат калия в дозе 0,25% масс. обеспечивает стерильность композиции. Для обеспечения стерильности при увеличении срока годности данного медицинского изделия в качестве стерилизующей дозы гамма-облучения можно выбрать 15 кГр.

*Т.С. Быркина, А.В. Колаева, Н.Д. Олтаржевская*

### **ПОДБОР КОНСЕРВАНТА ДЛЯ АЛЬГИНАТНОЙ ГИДРОГЕЛЕВОЙ КОМПОЗИЦИИ**

*ООО «КОЛТЕКС», Москва*

**Актуальность.** В ходе научных разработок, проводимых компанией «Колетекс» созданы стерильные медицинские изделия «Колегель» с уникальными свойствами: пролонгированное действие, целенаправленная доставка лекарственного вещества к очагу поражения, и представляющие собой вязкие композиции на основе альгината натрия, с введенными в них различными лекарственными веществами.

**Цель исследования.** Высокая обсеменяемость альгината натрия и, как следствие, изготавливаемых из него изделий до стадии радиационной стерилизации, является основной проблемой, возникающей при производстве данной продукции марки «Колегель». Таким образом, главной целью является разработка способов уменьшения микробной обсемененности данной продукции до финишной радиационной стерилизации.

**Задачи.** Подбор консервирующей добавки, которая в сочетании с финишной радиационной стерилизацией дозой, установленной в техническом регламенте, обеспечивала бы стерильность данной композиции.

**Материалы и методы.** Нами были выбраны следующие консервирующие добавки: DS 4 (4% сорбиновой кислоты, заключенной в мицеллы), DS 12 (12% бензойной кислоты, заключенной в мицеллы), DS 44 (4% сорбиновой кислоты и 4% бензойной кислоты, заключенных в мицеллы), сорбат калия, бензойная кислота, смесь сорбата калия и бензойной кислоты.

**Результаты.** По итогам экспериментов установлено, что добавление в гидрогелевую композицию на основе альгината натрия сорбата калия в концентрации 0,25% масс. в сочетании с гамма-стерилизацией дозой 6 кГр обеспечивает стерильность данной композиции, а также препятствует снижению ее вязкости после финишной стерилизации. Гамма-стерилизация альгинатной гидрогелевой композиции с добавлением 0,25% сорбата калия дозой 15 кГр также обеспечивает ее стерильность, а вязкость удовлетворяет требованиям технического регламента предприятия. Необходимо отметить, что стерильность гидрогелевой композиции на основе альгината натрия в сочетании с радиационной стерилизацией также обеспечила смесь 0,15% сорбата калия и 0,15% бензойной кислоты.

**Вывод.** Установлено, что сорбат калия в дозе 0,25% масс. обеспечивает стерильность композиции. Для обеспечения стерильности при увеличении срока годности данного медицинского изделия в качестве стерилизующей дозы гамма-облучения можно выбрать 15 кГр.

*М.Л. Бычков, А.В. Яголович, М.Э. Гаспарян, Д.А. Долгих*

### **DR5-B – СЕЛЕКТИВНЫЙ К РЕЦЕПТОРУ СМЕРТИ DR5**

### **МУТАНТНЫЙ ВАРИАНТ ЦИТОКИНА TRAIL ДЛЯ ТЕРАПИИ TRAIL-УСТОЙЧИВЫХ ОПУХОЛЕЙ**

*ИБХ РАН, Москва*

TRAIL – цитокин семейства фактора некроза опухолей, вызывает апоптоз опухолевых клеток, связываясь с рецепторами смерти DR4 и DR5, не затрагивая нормальные клетки. Однако терапевтическое применение TRAIL ограничено, так как более половины опухолевых клеток нечувствительны к нему отчасти из-за взаимодействия цитокина с непроводящими апоптоз рецепторами «ловушками» DcR1 и DcR2. Нами был получен уникальный DR5-селективный мутантный вариант TRAIL DR5-B, который связывается с DR5 так же эффективно, как и TRAIL, однако практически не связывается с остальными рецепторами TRAIL. Сравнительный анализ цитотоксичности TRAIL и DR5-B показал, что на 9 из 12 линий клеток DR5-B убивал в 1,5 – 5 раза больше раковых клеток по сравнению с TRAIL и не проявлял токсичность по отношению к нормальным клеткам. Химиопрепараты доксорубин, паклитаксел и бортезомиб усиливали действие вариантов TRAIL, но для большинства типов клеток эффект усиления был ярче выражен для DR5-B. При совместном применении с химиопрепаратами полумаксимальные эффективные концентрации ( $ЭК_{50}$ ) для DR5-B были в 1,5 – 10 раз ниже по сравнению с TRAIL. Таким образом, препарат DR5-B можно рассматривать в качестве перспективного средства как для монотерапии, так и для комбинирования с химиотерапией, при лечении TRAIL-устойчивых опухолей.

*П.М. Бычковский<sup>1</sup>, А.В. Ваккер<sup>2</sup>, Т.Л. Юркиштович<sup>1</sup>, Д.А. Адамчик<sup>1</sup>*

### **ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА «ЦИСПЛАЦЕЛ» ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВЫ И ШЕИ**

<sup>1</sup>Учреждение БГУ «НИИ физико-химических проблем», Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Минск, Республика Беларусь

**Задача исследования.** Клиническое изучение возможности и эффективности локального применения препарата «Цисплацел» при опухолях в области головы и шеи проводилось в два этапа на базе РНПЦ онкологии и медицинской радиологии.

**Материалы и методы.** Препарат применен у 66 больных (30 – 74 года) плоскоклеточным раком органов головы и шеи, у которых во время операции была клинически установлена спаянность опухоли с магистральными сосудами и нервами шеи, врастание в глубокие мышцы шеи и др. У абсолютного большинства больных распространенность процесса соответствовала IV стадии. В контрольную группу включены 36 больных с идентичными с основной группой по распространенности опухолями, лечение которых осуществлялось без применения препарата «Цисплацел».

Салфетки «Цисплацела» укладывались на мышцы, стволы блуждающего нерва, шейного и плечевого сплетений, твердую мозговую оболочку, на сосудисто-нервный пучок шеи и даже на денудированный участок внутренней сонной артерии. Послеоперационная рана зашивалась наглухо. Наблюдение за больными продолжалось от 10 до 30 дней.

**Результаты.** В месте расположения салфеток с цисплатином, раздражение и некроз тканей, даже в тканях орбиты, не отмечены. Каких-либо жалоб, кроме обычных, присущих данному виду вмешательства, больные не предъявляли. Со стороны указанных нервов симптомов связанных с их раздражением не наблюдалось. Не наблюдались и изменения показателей крови. Ни у одного больного в месте расположения препарата не наблюдалось нагноение раны.

В результате местного применения салфеток «Цисплацела» в исследуемой группе рецидивы в месте укладки «Цисплацела» диагностированы у 30 пациентов (45,4 %). У 36 больных опытной группы (54,6 %) рецидивы отсутствовали. В контрольной группе рецидивы опухоли возникли у 23 человек (64,9 %), отсутствие рецидивов наблюдалось у 13 пациентов (36,1 %). Результаты лечения коррелируют с дозой цисплатина помещенного в рану. Так среди 42 пациентов, получивших до 22 мг цисплатина, и прослеженных в течение 3 и более лет, у 17 человек (40,5 %) рецидивы не обнаружены. Среди 12 больных, получивших 75 мг препарата – 8 здоровы, и только у 4 пациентов возникли рецидивы, на 1 – 2 месяца позже, чем в контрольной группе.

**Заключение.** Проведенное исследование показало, что имплантация препарата в рану абсолютно безопасна, безболезненна, не вызывает некрозы и раздражение тканей, не ухудшает и не удлинняет заживление ран и время госпитализации. Применение «Цисплацела» снижает вероятность возникновения рецидивов в месте его имплантации на 15 – 30 %.

*А.В. Ваккер<sup>1</sup>, О.В. Курсаков<sup>2</sup>, В.В. Сушевич<sup>2</sup>*

### ПОСТРЕГИСТРАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ ГЕНЕРИЧЕСКОГО ХИМИОПРЕПАРАТА «МЕТОТРЕКСАТ»

<sup>1</sup>РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>РУП «Белмедпрепараты», Минск, Беларусь

**Актуальность.** В Беларуси на РУП «Белмедпрепараты» разработано генерическое лекарственное средство «Метотрексат-БМП, таблетки 5 мг». В РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова было проведено его пострегистрационное открытое рандомизированное исследование эффективности, переносимости и безопасности в сравнении с лекарственным средством «Метотрексат-ЭБЕВЕ, таблетки 5 мг» (производство EBEWE PHARMA Ges. M.V.H.Nfg.KG, Австрия).

**Материалы и методы.** В исследование были включены 67 пациентов с инкурабельным плоскоклеточным раком органов головы и шеи, подлежащие симптоматическому лечению и получившие до включения в испытания лучевую терапию (70 Гр) и по 2 – 4 курса адьювантной химиотерапии, 29 человек были также оперированы. После рандомизации пациенты исследуемой группы в качестве лечения получали монотерапию «Метотрексатом-БМП», по 25 – 40 мг одномоментно, 1 раз в неделю; пациенты контрольной группы – монотерапию «Метотрексатом-ЭБЕВЕ» в той же дозировке. В общий анализ были включены 60 добровольцев, получивших не менее 3 курсов химиотерапии (Me = 5).

**Результаты.** Побочные реакции (тошнота I ст., повышение температуры, сонливость и др.) в основной и контрольной группах, наблюдались у единичных пациентов, в первые 1 – 2 дня. Гематологическая токсичность и мукозиты у пациентов обеих групп не наблюдались. Общее состояние пациентов во время лечения не ухудшалось. Анализ результатов лечения после третьего курса, показал отсутствие статистических различий ( $p > 0,05$ ) в уровне терапевтической эффективности препаратов основной и контрольной групп. Данный вывод подтверждается анализом позитивного эффекта (доля ремиссии и стабилизации от общего числа пациентов группы) в сравнении исследуемого и контрольного препаратов по критерию  $\chi^2 (2 \times 2) = 2,41$  (при  $df=1$  кр. значение 3,841 для  $p < 0,05$ ; коэф. Йетса 1,67). При анализе длительности выживаемости по величинам  $\bar{T}$  за период более одного года не выявлено достоверных различий ( $d=129,3 \pm 77,6$  ( $p > 0,05$ );  $t = 1,7$ ), аналогично и при анализе медиан (Me) дожития ( $d=29,0 \pm 51,6$ ; ( $P > 0,05$ )) и анализе процентилей (25 %) и (75 %) также не было выявлено достоверных различий ( $p > 0,05$ ). Количество пациентов после третьего терапевтического курса без признаков прогрессирования заболевания, как в контрольной, так и в исследуемой группах было в равной степени ( $d=23,3 \pm 12,6$ ; ( $p > 0,05$ )). Противоопухолевый эффект после третьего курса был равнозначным ( $d=14,3 \pm 17,02$ ; ( $p > 0,05$ )). Цензурированный процент (по методу Каплана-Майера), за анализируемый период, для Метотрексата-БМП составил 16,7; для Метотрексата-ЭБЕВЕ – 30,4. Кумулятивный коэффициент выживаемости и динамика его снижения на протяжении года у обоих препаратов были одинаковы.

**Вывод.** Выявлена удовлетворительная переносимость и равнозначная эффективность лекарственных средств у пациентов обеих исследуемых групп, включая длительный (до 21 курса) период применения Метотрексата-БМП.

*Е.П. Ветчинкина, А.А. Широков, Н.А. Наволокин, А.Б. Бучарская, Д.А. Мудрак, С.А. Тычина, Н.В. Корчаков, Г.Н. Маслякова, В.Е. Никитина*

### ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ У ВЕЩЕСТВ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

**Задача исследования.** Разработка новых методов лечения онкологических заболеваний приоритетная задача здравоохранения, особенно внедрение высокоэффективных нетоксичных природных лекарственных препаратов с минимальными побочными эффектами. Наиболее перспективными в этом плане являются базидиомицеты *Lentinus edodes* и *Ganoderma lucidum*, содержащие вещества с широким спектром биологического действия.

**Материалы и методы.** В работе изучали противоопухолевое действие экстрактов из погруженного мицелия *L. edodes* штамм F-249 (1 опытная группа), *G. lucidum* штамм 1315 (3 группа) и его плодовых тел (2 группа). Противоопухолевую активность оценивали на белых беспородных крысах, которым было имплантировано подкожно по 0,5 мл 25% взвеси опухолевых клеток штамма рака почки РА (из банка РОНЦ им. Н.Н. Блохина). Через 72 часа после перевивки крысам опытных групп в течение 10 дней перорально вводилось по 1 мл экстрактов. Ежедневно, с 5-го дня после перевивки, измеряли объем опухолей, на 14-й день животных выводили из эксперимента и проводили гистологическое исследование опухоли.

**Результаты.** Начиная с 6 дня после перевивки, отмечали задержку роста опухоли в 1 и 3 группах под влиянием экстракта грибов. Масса опухоли на 14 день после перевивки в 1 группе, получавшей экстракт *L. edodes*, была в 2 раза меньше, чем в контрольной группе. В группе сравнения некрозы опухоли составляли 10 – 20 % от площади среза, митозы – до 3 %. В 1 группе капсула опухоли неизменная, некрозы составляли от 50 до 80 %, опухолевые клетки с дистрофическими изменениями отделены друг от друга. Опухолевые клетки были представлены только под капсулой опухоли, выявлялись единичные митозы. Во 2 группе – капсула опухоли фиброзная, утолщенная, полнокровная, слабо инфильтрирована единичными нейтрофилами, лимфоцитами. Некрозы в опухоли составляли от 30 до 50 %, опухолевые клетки с дистрофическими изменениями, местами неизменные, расположены ближе к капсуле. В 3 группе – капсула опухоли неизменная, некрозы в опухоли составляли от 50 до 90 %, опухолевые клетки с дистрофическими изменениями, отмечались признаки апоптоза. Неизменные опухолевые клетки сохранялись только под капсулой, митозы были единичными.

**Выводы.** Таким образом, установлено, что водные экстракты из погруженного мицелия *L. edodes* и *G. lucidum* обладают самостоятельным противоопухолевым действием, отмечается выраженное торможение роста первичной опухоли почки РА, развитие дистрофических изменений опухолевых клеток и некротических процессов в опухоли.

А.Ю. Вигоров, И.А. Низова, Д.А. Груздев, А.А. Тумашов, Г.Л. Левит, В.П. Краснов

### СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ *N*-(2-АМИНОПУРИН-6-ИЛ)ГЛИЦИНА С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

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

**Актуальность.** Соединения, сочетающие в своей структуре фрагмент пуринового основания и пептидный фрагмент, представляют интерес в качестве соединений с потенциальной биологической активностью, а также основы для синтеза модифицированных нуклеозидов. Среди пуринил-олигопептидов известны вещества с цитотоксической и иммуносупрессивной активностью.

**Задача исследования.** Разработка метода синтеза пептидов на основе *N*-(2-аминопурин-6-ил)глицина.

**Материалы и методы.** Исходя из 2-амино-6-хлорпурина, разработан трехстадийный метод синтеза *N*-(2-ацетамидопурин-6-ил)глицина, который заключается в защите аминогруппы в положении 2 ацетилированием, замещении хлора в положении 6 действием *трет*-бутилового эфира глицина и удалении *трет*-бутильной группы трифторуксусной кислотой.

Исследована конденсация *N*-(2-ацетамидопурин-6-ил)глицина с метиловыми эфирами аминокислот под действием различных конденсирующих агентов и установлено, что оптимальными условиями синтеза целевых дипептидов (выходы 60-70%) является использование в качестве конденсирующего агента тетрафторбората *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуриона (ТВТУ) в присутствии органического основания (триэтиламин, диизопропиламин) в диметилсульфоксиде. Синтезированы дипептиды на основе (*S*)-аланина, (*S*)-фенилаланина, (*S*)-валина, (*S*)-лейцина, (*S*)-метионина, (*S*)- и (*R*)-аспарагиновой кислоты, (*S*)- и (*R*)-глутаминовой кислоты, а также не природной аминокислоты (2*S*,4*S*)-4-амино-5-оксо-1-фенилпролина.

На примере дипептидов, имеющих в своем составе фрагменты (*S*)-аспарагиновой и (*S*)-глутаминовой кислот, показано, что деблокирование функциональных групп при сохранении пептидной связи в щелочных условиях (1 М NaOH, 20 °С, 3 суток) открывает путь к синтезу пептидов со свободными карбоксильными группами.

Строение синтезированных соединений подтверждено данными спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и элементного анализа. Химическая чистота подтверждена данными ВЭЖХ.

**Результаты и выводы.** Разработан метод синтеза *N*-(2-ацетамидопурин-6-ил)глицина и пептидов на его основе для исследования их противоопухолевой активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 14-13-01077).

Л.В. Винокурова<sup>1</sup>, М.А. Агафонов<sup>1</sup>, Г.Г. Варваница<sup>1</sup>, В.К. Финн<sup>2</sup>, Е.С. Панкратова<sup>2</sup>, Д.А. Добрынин<sup>2</sup>

### ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ТИПА ДСМ ДЛЯ АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ

<sup>1</sup>ГБУЗ МКНЦ ЦНИИГ ДЗМ, Москва

<sup>2</sup>ВИНИТИ РАН, Москва

**Цель исследования.** Применить метод интеллектуальной системы типа ДСМ (название в честь Джона Стюарта Милля) для прогнозирования развития сахарного диабета панкреатогенного генеза (СД) у больных хроническим панкреатитом.

**Материалы и методы.** В секторе интеллектуальных систем ВИНТИ создана интеллектуальная система типа ДСМ, основанная на ДСМ-методе автоматического порождения гипотез. Существующая ИнтДСМ включает в себя: ИнтДСМ = Решатель задач + Информационная среда (база фактов (БФ) и база знаний (БЗ) + интеллектуальный интерфейс (диалог + представление результатов + научение работе с системой). **Результаты.** На первом этапе средствами ДСМ-системы правилами правдоподобного вывода первого рода (индукцией) на обучающей выборке из 81 больных порождались гипотезы 1-го рода: наличие у больного конкретного набора признаков есть причина наличия или отсутствия диагноза СД. На втором этапе с использованием гипотез первого рода правилами 2-го рода доопределялось наличие или отсутствие СД у 42 больных, представленных на прогноз. В результате компьютерных исследований 10 больных были доопределены положительно, т.е. им был поставлен диагноз СД, 28 больных были доопределены отрицательно. Результаты доопределений совпали с реальными медицинскими данными (точность доопределений – 100 %, а полнота – 90 %).

**Заключение.** Предлагаемая интеллектуальная система является инструментом поддержки медицинских исследований со сложно структурированными данными и множеством фактов, необозримых без использования компьютерных технологий, Результаты применения ДСМ-метода, как средства анализа медицинских данных, указали на новый инструмент доказательной медицины.

*Д.Ю. Владимирова, Н.А. Подзорова, Е.Ю. Златник, Е.М. Непомнящая, Н.П. Захарова*

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕФНОТА (РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ ТИМОЗИН-АЛЬФА1) В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ России, Ростов-на-Дону*

**Цель исследования.** Изучение влияния Рефнота на эффективность неоадьювантной полихимиотерапии (ПХТ) у больных раком молочной железы (РМЖ) IIВ-IIIВ стадии.

**Материалы и методы.** Основные критерии включения: ECOG $\leq$ 1, адекватная функция почек, печени, костного мозга, отсутствие отдаленных метастазов. Рефнот в дозе 200000 МЕ применялся перитуморально в 1 – 5 день (за 30 минут до введения цитостатиков), в комбинации со стандартными режимами ПХТ (FAC или PA). С апреля 2012 г. по октябрь 2013 г. в исследование были включены 82 больных РМЖ IIВ – IIIВ стадии, в возрасте от 29 до 69 лет; средний возраст 53,3 $\pm$ 1,1 лет. Пациенты группы А (30 человек) получали Рефнот в комбинации с ПХТ в режиме PA (17) и FAC (13) от 2 до 4 курсов. Пациенты группы В (52) получали стандартную ПХТ в режиме PA (28) и FAC (24) от 2 до 6 курсов.

**Результаты.** Объективный эффект в группе А был отмечен у 80 % больных, а в группе В у 71,1 %, включая полный регресс в 16,6 % и 7,7 % случаев соответственно ( $p<0,05$ ). Степень выраженности и частота проявлений токсических реакций в группе А были незначительно ниже, чем в группе В. Общая выживаемость в группе А 28,4 $\pm$ 1,1мес, в группе В 26,1 $\pm$ 1,4мес; бессобытийная выживаемость в группе А 26,9 $\pm$ 1,3мес, а в группе В 22,9 $\pm$ 1,2мес ( $p<0,05$ ). Количество CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток в группе А (РА) выше, чем в группе В (РА): 31,5 $\pm$ 2,8 % и 21,7 $\pm$ 2,25 % соответственно ( $p<0,05$ ). Содержание В-клеток (CD20<sup>+</sup>) при использовании обеих схем ПХТ снижалось у больных группы В (FAC) с 15,5 $\pm$ 0,53 % до 13,7 $\pm$ 0,55 %, и в группе В (РА) с 16,7 $\pm$ 0,97 % до 12,7 $\pm$ 1,0 % ( $p<0,05$ ). У больных группы А (РА) уровень CD20<sup>+</sup> после лечения 15,0 $\pm$ 1,0 %, а у больных группы А (FAC) 15,4 $\pm$ 1,4 %; в обоих случаях отличия от показателей больных группы В статистически достоверны ( $p<0,05$ ). В опухоли под действием Рефнота выявлено: выраженный фиброз стромального компонента, дистрофические, апоптоз и некробиоз в раковых клетках; миксоматоз стромы; мелкие очаги некроза; лимфоцитарная инфильтрация. В группе А отмечено увеличение числа лечебного патоморфоза III – IV степени, по сравнению с группой В: 33,2 % и 17,3 % соответственно ( $p<0,05$ ).

**Выводы.** Таким образом, перитуморальное применение рекомбинантного ФНО-Т обладает хорошей переносимостью, позволяет увеличить эффективность терапии больных РМЖ IIВ – IIIВ стадии, достигнуть увеличения числа лечебного патоморфоза III – IV степени, а также демонстрирует иммунокорригирующее действие.

*Е.Л. Водовозова<sup>1</sup>, А.С. Алексеева<sup>1</sup>, Н.Р. Кузнецова<sup>1</sup>, Н.В. Бовин<sup>1</sup>, О.Н. Щегловитова<sup>2</sup>, Е.В. Степанова<sup>3</sup>*

### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ,**

### **НЕСУЩИХ УГЛЕВОДНЫЙ ЛИГАНД СЕЛЕКТИНОВ,**

### **С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ СОСУДОВ КРОВИ**

<sup>1</sup>ФГБУН ИБХ РАН, Москва

<sup>2</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрав РФ, Москва

<sup>3</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** Ранее нами показано, что 100-нм липосомы из природных фосфолипидов и липофильного пролекарства мелфалана, несущие лиганд селективных SiaLe<sup>X</sup>, вызывают антивазкулярный эффект и сильнее ингибируют рост карциномы легкого Льюис, по сравнению с липосомами без вектора. Селектины экспрессируются на эндотелии в ответ на факторы воспаления и опухолеобразования.

**Цели исследования.** Изучить влияние введения SiaLe<sup>X</sup>-лиганда на механизмы взаимодействия липосом с эндотелиальными клетками.

**Материалы и методы.** Использовали первичные культуры клеток эндотелия из пупочной вены человека, флуоресцентные трекеры клеточных органелл, цитометрию и конфокальную микроскопию. Клетки активировали фактором некроза опухоли hTNF $\alpha$ . Липосомы метили по липидному бислою флуоресцентным фосфолипидом на стадии получения липидной пленки перед экструзией, либо двойной меткой (фосфолипидом в бислое и кальцеином во внутреннем водном объеме); включение меток в липосомы контролировали флуориметрически и спектрофотометрически после гель-хроматографии на сефадексе G-50.

**Результаты и выводы.** Связывание и поглощение липосом активированными клетками росло пропорционально содержанию SiaLe<sup>X</sup>. Поглощение сопровождалось дестабилизацией мембраны липосом, необходимой для высвобождения пролекарства. Неактивированные клетки связывали мало липосом вне зависимости от содержания SiaLe<sup>X</sup>, причем липосомы сохраняли интактность. Наши результаты свидетельствуют о селективности действия SiaLe<sup>X</sup>-липосом на активированные эндотелиальные клетки.

*В.Н. Волгин<sup>1</sup>, Е.Ф. Странадоко<sup>2</sup>, Г.В. Пономарев<sup>3</sup>, В.А. Пурихванидзе<sup>4</sup>, П.Г. Орлова<sup>4</sup>*

### **ПРИМЕНЕНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ДЕРМАТОЛОГИИ И КОСМЕТОЛОГИИ**

<sup>1</sup>ФГКУ «ГВКГ ИМ. АКАД. Н.Н. БУРДЕНКО», МОСКВА

<sup>2</sup>ФГБУ «ГНЦ ЛМ ФМБА РОССИИ», МОСКВА

<sup>3</sup>ИБМХ ИМ. В.Н. ОРЕХОВИЧА, МОСКВА

<sup>4</sup>ЦЕНТР ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ «ЛАЗЕРВИТА», МОСКВА

Актуальность. в последнее время все больше расширяется спектр применения фотодинамической терапии (ФДТ) при различных заболеваниях.

**Цель исследования.** Разработка оптимальных режимов ФДТ с фотосенсибилизатором фотодитазином при различной патологии кожи и слизистых.

**Материалы и методы.** Лечение методом ФДТ с фотодитазином проведено 127 больным с базально-клеточным раком кожи (БКРК). Возраст больных колебался от 20 до 93 лет, составляя в среднем 66,2 года. Мужчин было 98 (77,2%), женщин – 29 (22,8%). Также проведено лечение больных с плоскоклеточным раком кожи (8), метатипическим раком кожи (4), болезнью Кейра (22), эрозией шейки матки (7), лейкоплакией (26), трофическими язвами (28). 36 пациенткам проведено фотоомоложение кожи лица и шеи. Использовали лазерные установки Аткус-2, Кералаз, Кристалл. Выходная мощность лазеров составляла 0,1 – 3,0 Вт. Плотность мощности излучения 0,1 – 0,5 Вт/см<sup>2</sup>. Фотодитазин вводили внутривенно из расчета 0,7 – 1,2 мг/кг и наносили аппликационно в дозе 2 мкл/см<sup>2</sup>. Оценка результатов ФДТ проводилась по следующим критериям: полная резорбция (ПР) опухоли – отсутствие признаков опухолевого роста; частичная резорбция (ЧР) – уменьшение размеров опухоли не менее чем на 50 %; без эффекта (БЭ) – уменьшение размера опухоли не менее чем на 50 %.

**Результаты.** При БКРК ПР опухолей наступила у 118 (92,9 %) больных, частичная – у 9 (7,1 %). В процессе исследования отработана доза световой энергии при использовании фотодитазина. Оценена эффективность доз световой энергии от 50 до 500 Дж/см<sup>2</sup>. Наиболее оптимальной дозой для поверхностных очагов оказалась 100 – 200 Дж/см<sup>2</sup>, солидных образований – 200 – 300 Дж/см<sup>2</sup>, а язвенных и экзофитных форм опухолей с глубоким инфильтративным ростом – 300 – 500 Дж/см<sup>2</sup>.

При лечении ПКРК и МТРК ПР наступила в 66,7 % случаев, ЧР – в 25,0 %, БЭ – в 8,3 %. При лечении болезни Кейра ПР наступила в 77,3 %. При лечении трофических язв полное их разрешение произошло в 78,6 % случаев, остальные значительно уменьшились в размерах. При лечении лейкоплакии, эрозии шейки матки за 1 – 3 сеанса ПР наступила во всех случаях. Фотоомоложение кожи лица и шеи имело стойкий эффект в 83,3 % случаев, у остальных – значительное улучшение.

**Выводы.** Проведенный анализ позволяет сделать вывод, что ФДТ можно использовать при заболеваниях кожи и слизистых различной этиологии и при инволютивных изменениях кожи с высоким терапевтическим эффектом.

*Н.Ф. Гамалея<sup>1</sup>, А.М. Коробов<sup>2</sup>, Г.В. Пономарев<sup>3</sup>, И.А. Штень<sup>1</sup>*

### **СПЕКТРАЛЬНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ФОТОИНДУКЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА, ОПОСРЕДОВАННОЙ ДИМЕГИНОМ**

<sup>1</sup>ИЭПОР имени Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

<sup>2</sup>ХНУ имени В.Н.Каразина, Харьков, Украина

<sup>3</sup>ИБМХ имени В.Н.Ореховича РАМН, Москва, Россия

**Цель исследования.** Поскольку в работе в качестве фотосенсибилизатора использовался димегин, имеющий пять полос поглощения в видимой области спектра, интересно было сравнить динамику генерирования синглетного кислорода под действием излучения, попадающего в его различные полосы поглощения.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовались три светодиодных источника, максимумы полос излучения которых соответствовали трем максимумам полос поглощения димегина: 405 нм (полоса Core), 501 нм и 608 нм. Ширина полосы излучения светодиодов по уровню половинной интенсивности составляла 25 – 30 нм. Мощность излучения каждого светодиода равнялась 25 мВт, плотность мощности на облучаемой поверхности составляла 3 мВт/см<sup>2</sup>. Уровень продукции синглетного кислорода (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) в пробах определяли по интенсивности флуоресценции специфического индикатора SOSG. Регистрацию флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра NanoDrop ND-3300 (США).

**Результаты и выводы.** При облучении раствора димегина светодиодными источниками с параметрами, указанными выше, наблюдался практически линейный рост продукции синглетного кислорода с увеличением дозы света, независимо от его длины волны. Однако скорость роста продукции <sup>1</sup>O<sub>2</sub> прямо зависела от интенсивности абсорбции света фотосенсибилизатором и была максимальной при облучении димегина фиолетовым светом, попадающим в полосу поглощения Core. Скорость продукции <sup>1</sup>O<sub>2</sub> димегином была минимальной при облучении его светом оранжевого диапазона, абсорбция которого ниже таковой для фиолетового диапазона почти в 30 раз. Скорость продукции <sup>1</sup>O<sub>2</sub> димегином при облучении его зеленым светом, отличающимся по абсорбции от фиолетового света в 6,6 раза, занимала промежуточное значение. Из этого следует, что включение в фотодинамический процесс излучения, попадающего в коротковолновые полосы поглощения многополосных фотосенсибилизаторов, является целесообразным в случаях поверхностной локализации патологического процесса, поскольку излучение коротковолновых участков видимого диапазона спектра проникает в ткани на небольшую глубину.



Н.В. Голубцова, М.В. Оборотова, К.И. Жордания, О.С. Бурова, В.И. Карасева,  
К.А. Барышников, Л.Т. Мамедова, А.Ю. Барышников

### ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ИКО-406 ПРОТИВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Цель исследования.** Получение моноклональных антител против маркера стволовых клеток человека.

**Материалы и методы.** Штамм ИКО-406 получали путем слияния клеток мышинной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/C, предварительно иммунизированных внутривенно клетками перевиваемой клеточной линии меланомы кожи человека mel Kog (происхождение – подкожный метастатический узел пациентки с диссеминированной меланомой кожи). Слияние проведено при помощи раствора полиэтиленгликоля ПЭГ/ДМСО («Sigma»). Экспрессию антигенов на клеточной поверхности проводили при помощи реакции непрямой иммунофлуоресценции (РИФ). Полученные результаты оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™II.

**Результаты и выводы.** Супернатанты возникших после гибридизации колоний тестировали методом РИФ на клетках перевиваемой клеточной линии меланомы кожи человека mel Kog, не имеющей антигенов гистосовместимости первого и второго класса, и экспрессирующей 80 – 90 % антигенположительных клеток к маркеру CD117, который находится на поверхности опухолевых стволовых клеток. В супернатанте одной из лунок была выявлена специфическая реакция с клетками mel Kog, используемой в качестве иммуногена. Образцы распределения гистограмм иммунофлуоресценции полученных МКА в сравнении с коммерческими антителами CD117 («MACS Miltenyi Biotec», Германия) показали их идентичность по интенсивности свечения и частоте встречаемости, выявляя одинаковый процент антигенположительных клеток.

Н.В. Голубцова<sup>1</sup>, И.Н. Михайлова<sup>1</sup>, А.А. Молодых<sup>1</sup>, Л.Ф. Морозова<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>1</sup>, П.К. Иванов<sup>1</sup>,  
Л.В. Демидов<sup>1</sup>, А.Ю. Барышников<sup>1</sup>

### ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО УРОВНЯ $\beta$ 2-МИКРОГЛОБУЛИНА У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Задачи исследования.** Изучение содержания сывороточного уровня  $\beta$ 2-микроглобулина у больных диссеминированной меланомой в процессе адьювантной терапии противоопухолевой аллогенной вакциной «Мелавак».

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили образцы сывороток крови 15 больных диссеминированной меланомой, полученные до и после проведения адьювантной иммунотерапии вакциной «Мелавак», созданной на основе облученных клеток линии меланомы человека mel Kog, трансфицированных геном ГМ-КСФ. Средний возраст пациентов составил  $51 \pm 2$  лет. В качестве контроля использовались образцы сывороток крови 13 здоровых доноров, сопоставимых по возрасту с больными. Определение сывороточного уровня  $\beta$ 2-микроглобулина ( $\beta$ 2М) проводилось иммуноферментным методом с использованием диагностической тест-системы для количественного определения (ORG5BM-beta-2-Microglobulin, Германия). Учет результатов проводился спектрофотометрическим методом при длине волны 450 нм. Результаты выражали в мг/л. Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Проведение статистического анализа данных проводилось с помощью пакета программ EXCEL 2003 и программы "Фактор Наука" [Колосов Е.А., Суслёва Н.А., 2001].

**Результаты и выводы.** При проведенном исследовании в ходе вакцинотерапии пациенты делились на две группы: первая группа ( $n=8$ ) с понижением или незначительным повышением показателей сывороточного уровня  $\beta$ 2-микроглобулина за время вакцинации и группа два ( $n=7$ ) с исходно повышенными значениями сывороточного уровня  $\beta$ 2-микроглобулина и последующим его увеличением в процессе проводимой адьювантной терапии противоопухолевой аллогенной вакциной «Мелавак». При проведенном анализе выживаемости выявлено достоверное увеличение времени до прогрессирования ( $p < 0,001$ ) и увеличение общей выживаемости ( $p < 0,02$ ) в первой группе пациентов. Установлено, что повышение сывороточного уровня  $\beta$ 2-микроглобулина на фоне проводимой вакцинотерапии сопровождается уменьшением времени до прогрессирования и общей выживаемости, а снижение уровня  $\beta$ 2-микроглобулина указывает на благоприятное течение заболевания.

П.В. Гольшико<sup>1,2</sup>, С.В. Ананьев<sup>1</sup>, К.А. Барышников<sup>1</sup>, Д.В. Новиков<sup>3,1</sup>, В.В. Новиков<sup>3</sup>

### РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ ГЕНЫ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>ГКБ № 57, Москва

<sup>3</sup>НИИ молекулярной биологии и регионарной экологии Нижегородского Государственного Университета им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

**Актуальность.** Раково-тестикулярные антигены (РТА) представляют собой группу опухоли-ассоциированных белков, экспрессия которых в норме ограничена только репродуктивными тканями взрослого человека и эмбриональными тканями. При злокачественной трансформации наблюдается aberrантная гиперэкспрессия РТА и их генов.

**Цель исследования.** Определение мРНК 20 наименований РТА в образцах опухоли и периферической крови 98 больных колоректальным раком.

**Материалы и методы.** мРНК шести наименований генов семейства MAGEA – MAGE-A1, MAGE-A2 MAGE-A3 MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6 – определяемых одновременно с помощью метода, позволяющего выявлять общую для всех шести генов нуклеотидную последовательность мРНК; мРНК восьми генов семейства GAGE (GAGE1-8), также одновременно определяемых по общей для всех нуклеотидной последовательности, мРНК трех генов семейства SSX (SSX1, SSX2, SSX4), мРНК генов XAGE1, NY-ESO1 и мРНК гена MAGEC1.

**Результаты.** Обнаружено, что выявление мРНК раково-тестикулярных генов можно использовать в качестве мониторинговых тестов. Наличие в крови больного колоректальным раком мРНК генов MAGE-C1 и XAGE1 может быть потенциальным маркером более благоприятного течения заболевания. В то же время, мРНК MAGE-A1-6, GAGE1-8 и SSX1,2,4 генов могут свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе.

**Заключение.** Таким образом, выявление мРНК раково-тестикулярных генов можно использовать в качестве мониторинговых тестов. Так, наличие в крови больного колоректальным раком мРНК генов MAGE-C1 и XAGE1 может быть потенциальным маркером более благоприятного течения заболевания. В то же время, мРНК MAGE-A1-6, GAGE1-8 и SSX1,2,4 генов могут свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе.

Г.А. Гордина, О.И. Тарасова, И.Ю. Кубасова, А.В. Киселев, А.Е. Пастушенко

### ПАТЕНТЫ И СВИДЕТЕЛЬСТВА НА ОБЪЕКТЫ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ФГБНУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА» В 2014 Г.

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

Из 70 научных тем, планируемых в 2014 году, признаны охраноспособными 21 (30 %), при этом доля НИИ ЭДиТО составила 75 %. Из 40 тем аннотаций диссертаций охраноспособными признаны 10 (25 %).

В 2014 году в РОНЦ поддерживались 69 патента на изобретения, из них: 10 патентов - на соединения и композиции, обладающие противоопухолевой активностью; 17 – на клеточные линии меланомы для создания противоопухолевых вакцин; 14 – способов лечения злокачественных опухолей; 15 – способов ранней диагностики злокачественных опухолей; 4 - способа получения трахеобронхиального биоимпланта и биоинженерной конструкции для замещения костных дефектов.

Поддержание 5 патентов было прекращено в виду их невозможного использования в коммерческих целях.

В 2014 г. было подготовлено и подано в Роспатент 11 заявок на объекты интеллектуальной собственности. Из их числа 7 заявок - на изобретения противоопухолевых средств и 4 заявки на способ диагностики и лечения в эксперименте и в клинике. За этот период получено 8 патентов на изобретения и одно свидетельство на программу для ЭВМ. Объектами 6 патентов на изобретения были способы диагностики, профилактики или лечения. Один патент получен на устройство и один - на полезную модель.

В целях стимулирования изобретательской деятельности авторы патентов изобретений и свидетельства на программу ЭВМ были отмечены денежными вознаграждениями.

О.В. Горюнова, Г.Н. Апрышко, Р.Б. Пугачёва, О.С. Жукова, Л.В. Фетисова, Н.П. Яворская, И.С. Голубева

### ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛО[2,3-А]КАРБАЗОЛОВ

ФГБНУ «РОНЦ им.Н.Н. Блохина», Москва

**Цель исследования.** Синтез и исследование новых производных индолакарбазолов с целью обнаружения высокоэффективных противоопухолевых соединений с широким спектром действия.

**Материалы и методы.** Методы химического синтеза. Компьютерная система PASS, прогнозирующая спектр биологической активности соединений по их химической структуре. МТТ-тест оценки цитотоксической активности веществ *in vitro*. Исследование противоопухолевой активности соединений *in vivo* путем оценки торможения роста опухолей (ТРО, %) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %) мышей с перевиваемыми опухолями. При исследовании растворенные в воде с добавлением при необходимости 10% ДМСО соединения вводили внутривентриально один раз в сутки в течение 5 дней. **Результаты.** Оригинальным методом получены N-глюкозиды и N-рибозиды индолакарбазолов, содержащие аминокислотные остатки при имидном атоме азота в пятичленном цикле агликона. С помощью компьютерной системы PASS для этих соединений получены высокая (около 75 – 80 %) вероятность проявления противоопухолевой активности и значительно более низкая (около 30 %) вероятность проявления цитостатической активности. При экспериментальном изучении в культурах опухолевых клеток человека CaOv, SKBR-3, SCOV-3 полученные соединения не проявили значимой цитостатической активности. 24 соединения изучены на мышах с перевиваемыми лимфоидным лейкозом P388, асцитной опухолью Эрлиха, эпидермоидной карциномой лёгкого LLC, раком шейки матки PШМ-5, меланомой B-16, аденокарциномой молочной железы АК-755, раком толстого кишечника АКАТОЛ. 4 соединения оказывали значимое противоопухолевое действие на медленно растущие, высокодифференцированные солидные опухоли PШМ-5 и АКАТОЛ. На мышах с PШМ-5 значимые величины ТРО от 60 до 83 % сохранялись с 18-го до 29-го дня после окончания лечения при УПЖ 25 %; на мышах с опухолью АКАТОЛ от 51 до 67 % ТРО сохранялись до 23-го дня после окончания лечения при УПЖ 30 %. Полученные данные позволяют рекомендовать эти соединения для дальнейшего углублённого изучения противоопухолевой активности. **Выводы.** По результатам первичного скрининга *in silico*, *in vitro* и *in vivo* 4 новых соединения из класса аминокислотных производных индолакарбазолов отобраны для углубленного изучения противоопухолевой активности как кандидаты для создания противораковых лекарств, не обладающих прямым цитостатическим действием.

Т.А. Григорьева, А.В. Гарабаджю, В.Г. Трибулович

### ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР В РАЗРАБОТКЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург

**Актуальность.** Известно, что большинство новообразований головного мозга являются вторичными. Чаще всего метастазами в головной мозг сопровождаются опухоли молочной железы, легких, почек, толстого кишечника и меланомы, причем в настоящее время отмечается значительное возрастание их частоты. Именно метастазирование зачастую становится причиной смертельного исхода заболевания, поскольку гемато-энцефалический барьер предотвращает попадание препарата, способного справиться с первичной опухолью, в мозг.

**Цель и задачи исследования.** Принципиальным отличием гемато-энцефалического барьера является наличие плотных контактов между клетками эндотелия, в результате чего вещества, не имеющие собственной транспортной системы, могут попасть в мозг только путем пассивной диффузии сквозь эндотелиоциты, мембраны которых содержат Р-гликопротеин, осуществляющий эффлюкс ксенобиотиков и лекарственных веществ обратно в кровяное русло. Нашей задачей было идентифицировать методы, позволяющие еще на стадии разработки оценить способность препаратов преодолевать гемато-энцефалический барьер.

**Материалы и методы.** Для исследований были выбраны классы производных индолинона и изоиндолинона. Последний обладает противораковой активностью за счет ингибирования взаимодействия белков MDM2 и p53. Соединения были подвергнуты ряду испытаний: 1) *In silico* оценка липофильности соединений при помощи коэффициента logP (программное обеспечение ALOGPS 2.1, <http://www.vcclab.org/lab/alogps>), 2) оценка способности веществ преодолевать ГЭБ при помощи QSAR (программное обеспечение PASS), 3) *in vitro* оценка способности веществ преодолевать мембраны (метод ПАМПА, искусственные липидные мембраны), 4) оценка способности веществ взаимодействовать с Р-гликопротеином при помощи QSAR (программное обеспечение PASS), 5) косвенная оценка способности веществ попадать в клетки по проявлению целевой активности *in vivo* (ингибирование взаимодействия MDM2-p53 в клетках U2OSp1 – оценивается общее количество выживших клеток и количество клеток с зеленым свечением, которое связано с p53-зависимой активацией экспрессией белка GFP, находящегося под промотором p21).

**Результаты и выводы.** Сравнение результатов, полученных разными методами показало, что величина коэффициента липофильности logP не может служить критерием при оценке способности веществ преодолевать ГЭБ; QSAR позволяет качественно предсказывать способность веществ преодолевать ГЭБ и взаимодействовать с Р-гликопротеином; метод ПАМПА является оптимальным для оценки способности веществ преодолевать ГЭБ методом пассивной диффузии, хотя и требует осуществления синтеза исследуемых веществ.

*Н.Я. Гридина, Н.Г. Драгунцова*

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАНАЛЬНЫХ БЛОКАТОРОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМНУ», Киев, Украина*

**Актуальность.** Современное лечение злокачественных глиом головного мозга характеризуется низкой эффективностью, появлением осложнений и побочных эффектов. В связи с этим возникает необходимость в подборе медикаментов, обладающих целенаправленным действием на определённые белки или рецепторы, ингибирование которых будет эффективным при торможении опухолевого роста и в то же время не оказывать побочного действия на организм.

**Целью работы** стало испытание в эксперименте на перевивной крысиной глиоме 101.8 (штамм получен из Института морфологии человека РАН, Москва, РФ) противоопухолевых свойств верапамила и кетамина – канальных блокаторов ионотропных NMDA-рецепторов.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовали 70 крыс линии Wistar 3 – 4-недельного возраста. Перевивку глиомы 101.8 осуществляли путём инъекции в левую теменную долю головного мозга суспензии 1 млн клеток опухоли в изотоническом растворе хлорида натрия. Отечественные препараты 0,25% раствора верапамила и кетамина (50 мг/мл) растворяли в безионной воде в 100, 1000 и 10 000 раз. Препараты в указанных разведениях вводили на 8-е сутки после перевивки крысам глиомы 101.8 ежедневно в объёме 50 мкл внутривентриально. Контрольной группе животных после перевивки в указанные сроки вводили внутривентриально раствор изотонического раствора в том же объёме.

**Результаты.** Применение разведений верапамила и кетамина в 100 раз не вызывало противоопухолевого эффекта. Использование разведений указанных препаратов в 10 000 и 100 000 раз привело к достоверному подавлению роста перевивной глиомы у крыс и увеличению продолжительности жизни животных ( $p \leq 0,01$ ). Отсутствие противоопухолевого эффекта при введении больших доз препаратов по сравнению с малыми дозами можно объяснить механизмом ингибирования NMDA-рецепторов на мембранах клеток крови и опухолевой ткани. Известно, что при патологии ионотропные рецепторы становятся более чувствительными и ингибируются значительно меньшими концентрациями канальных блокаторов по сравнению с нормой.

**Выводы.** В работе показан противоопухолевый эффект, вызванный применением канальных блокаторов верапамила и кетамина в больших разведениях, который опосредуется целенаправленным ингибированием ионотропных рецепторов мембран опухолевых клеток и клеток крови крыс с перевивной глиомой 101.8.

*М.А. Грин, А.Ф. Миронов*

### **НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПРИРОДНОГО БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *a* ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ**

*МИТХТ имени М.В. Ломоносова, Москва*

Выбор природного бактериохлорофилла *a* (Бхл *a*) в качестве лидерного соединения для создания новых фотосенсибилизаторов (ФС) обусловлен рядом причин, главная из которых – интенсивное поглощение в ближней ИК-области спектра (760 – 830 нм), открывающее новые возможности для диагностики и лечения глубокозалегающих и пигментированных опухолей.

Цель работы – создание устойчивых производных Бхл *a* с улучшенными спектральными характеристиками, повышенной гидрофильностью и обладающих значительной тропностью к опухолям. Структура Бхл *a* позволяет химически модифицировать молекулу пигмента с целью присоединения к нему борных кластеров, биологически активных молекул, включая липоевую кислоту, цистеамин и цистамин, молекул красителей различной природы, а также для иммобилизации ФС на наночастицы золота.

В рамках данного исследования были получены бактериоаминоамиды, биологические испытания которых показали высокую фотоиндуцированную активность в отношении клеток человека различного эпителиального происхождения (A549 и HEP2) при наномолярных концентрациях и дозозависимую противоопухолевую эффективность на модели опухоли животных S37. Изучение фотоцитотоксичности конъюгата, содержащего бактериохлорин, связанный с бис(дикарболлидом) кобальта, показало, что полученный ФС по значениям ИК<sub>50</sub> и ИК<sub>90</sub> для клеток глиобластомы в 4 – 6 раз превосходит аналогичный хлориновый конъюгат, исследованный нами ранее. Бактериопурпуринимид с остатком липоевой кислоты, иммобилизованный на наночастицах (ФС-Аu), в экспериментах на крысах с саркомой М-1 длительно циркулировал в кровотоке и имел повышенную тропность к опухоли за счет экстравазации наночастиц, нагруженных пигментом, из дефектных сосудов опухоли.

На основе бактериоаминоамида и дикарбоиндоцианинового красителя Су 5.5 впервые получен конъюгат, фотофизические свойства которого делают его потенциально пригодным для использования в ФДТ и ФД опухолей. Изучение биологической эффективности в гомологическом ряду диалкоксибактериопурпуринимидов, обладающих высокой стабильностью и поглощением в области 800 нм, позволило определить наиболее перспективный ФС, представляющий собой метиловый эфир *O*-пропилкосима *N*-пропоксибактериопурпуринимида. ФДТ с использованием данного препарата обеспечивает высокую фотоиндуцированную противоопухолевую активность в системе *in vitro* и *in vivo*, 100%-ное торможение роста опухоли (LLC) и 90% излеченность животных за счет селективного накопления в опухоли и быстрого выведения из организма.

Д.А. Груздев<sup>1</sup>, А.Ю. Вигоров<sup>1</sup>, Е.Н. Чулаков<sup>1</sup>, В.В. Мусияк<sup>1</sup>, Т.В. Матвеева<sup>1</sup>,  
Г.Л. Левит<sup>1</sup>, В.Н. Даниленко<sup>2</sup>, В.П. Краснов<sup>1</sup>

### ПОИСК НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ В РЯДУ КОНЬЮГАТОВ ПУРИНА НА ОСНОВЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ АМИНОВ

<sup>1</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

**Актуальность.** Многие соединения, включающие фрагменты пурина и 2-аминопурина, обладают высокой противоопухолевой активностью. Известно, что в ряду 6-замещённых производных пурина существуют модуляторы протеинкиназ – ферментов, представляющих важную мишень действия противоопухолевых препаратов. Так, среди конъюгатов 2-аминопурина с ароматическими аминами, связанными с положением 6 пурина с помощью линкерного фрагмента, имеются селективные ингибиторы Аигога А киназы.

В связи с этим синтез новых производных пурина может служить мощным инструментом создания потенциальных противоопухолевых агентов.

**Задача исследования.** Получение конъюгатов пурина и 2-аминопурина с хиральными гетероциклическими аминами, разработка методов анализа их изомерного состава и исследование противоопухолевой активности новых соединений в опытах *in vitro*.

**Материалы и методы.** Исходя из коммерчески доступных 6-хлорпурина и 2-амино-6-хлорпурина, нами синтезирован ряд новых конъюгатов пурина и 2-аминопурина, имеющих в своей структуре остатки гетероциклических аминов. Получены производные, в структуре которых остатки гетероциклических аминов связаны с пурином и 2-аминопурином по положению 6 напрямую, а также через линкерные фрагменты (остатки глицина и 6-аминокапроновой кислоты). Разработаны методы анализа энантиомерного состава производных 2-аминопурина с помощью ВЭЖХ на хиральных неподвижных фазах. Установлено, что синтез конъюгатов 2-аминопурина, исходя из оптически чистых аминов, не сопровождается рацемизацией и приводит к оптически чистым соединениям.

В настоящее время новые производные пурина и 2-аминопурина исследуются на наличие противоопухолевой активности на культурах клеток с использованием МТТ-теста.

**Результаты и выводы.** Синтезированы конъюгаты пурина и 2-аминопурина, включающие остатки гетероциклических аминов, соединённых с положением 6 пуринового фрагмента напрямую и с помощью линкеров. Проводится тестирование противоопухолевой активности полученных соединений в опытах *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант 14-13-01077).

И.Д. Гулякин, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова

### ВЫБОР КРИОПРОТЕКТОРА ДЛЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЛХС-1208

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

**Актуальность.** Липосомальная лекарственная форма (ЛФ) ЛХС-1208 при хранении недостаточно стабильна, для увеличения срока хранения требуется разработать режим сублимации. Липосомальные препараты при замораживании, лиофилизации и последующей регидратации подвержены разрушению и высвобождению значительной части действующего вещества в раствор. Добавление криопротекторов в водную фазу липосомальной дисперсии перед замораживанием с последующей сублимацией позволяет предупредить фазовое разделение липидной композиции и предохранить инкапсулируемое лекарство от вытекания и сохранить способность липосом к регидратации.

**Задача исследования.** Подбор криопротектора для разработки стабильной липосомальной ЛФ ЛХС-1208.

**Материалы и методы.** Субстанция ЛХС-1208 синтезирована в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Вспомогательные компоненты для получения липосомальной дисперсии: лецитин, холестерин и PEG-2000 DSPE, криопротекторы: глюкоза, маннит, сахароза, лактоза. Липосомы получают по методу Бэнгхема, упариванием ацетона - хлороформного раствора компонентов на роторном испарителе до образования полупрозрачной липидной пленки, которую гидратируют водой. Липосомы измельчают, последовательно пропуская через поликарбонатные мембранные фильтры Nuclepore с уменьшающимся размером пор 0,45 и 0,22 мкм на экструдере Lipex™ Thermobarrel Extruder 10 мл. Количественное определение содержания препарата проводят на спектрофотометре Cary 100 при длине волны 320 нм. Анализ среднего диаметра везикул измеряют на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp-380. Для измерения pH раствора используют pH-метр HANNA pH 211.

**Результаты и выводы.** Проведенный эксперимент показал, что по внешнему виду свежеприготовленные дисперсии липосом с разными криопротекторами не отличались друг от друга (светло-желтые, без признаков расслоения). Липосомальные дисперсии с глюкозой и маннитом после 3 суток хранения расслаивались на 2 фазы, внешний вид липосом с лактозой и сахарозой не изменился, а их средний диаметр после получения  $230 \pm 5$  нм, после 3 суток хранения  $255 \pm 5$  нм. Содержание ЛХС-1208 в липосомах с лактозой и сахарозой после получения и 3 суток хранения составляет 0,5 мг/мл, pH раствора  $7 \pm 0,5$ , объём липосомальной дисперсии в одном флаконе 6 мл. В настоящее время в целях повышения содержания ЛХС-1208 в растворе и уменьшения среднего диаметра липосом совершенствуется технология наработки липосомальной дисперсии с добавлением лактозы и сахарозы.

*Н.Н. Гурина, А.Д. Перенков, Д.В. Новиков, С.Г. Фомина, А.В. Калугин, В.В. Новиков*

### **УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ MUC1 В ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ТОЛСТОЙ КИШКИ**

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород*

**Актуальность.** Ген MUC 1 экспрессируется в эпителиальных клетках. В опухолевых клетках эпителиального происхождения регистрируется гиперэкспрессия гена и гипогликозилирование белка, что делает его потенциальной мишенью для иммунотерапии.

**Цель исследования.** Оценка уровня экспрессии MUC1 в опухолях молочной железы и толстой кишки. **Задачи исследования.** Сравнить уровень экспрессии мРНК MUC1 и референсного гена (в качестве которого был выбран в2-микроглобулин) и оценить экспрессию MUC1 в различных опухолевых тканях.

**Материалы и методы.** Методом Real-time ПЦР оценивали уровни экспрессии MUC1 относительно мРНК в 2-микроглобулина. Исследовали 24 образца опухолевых очагов больных раком молочной железы и 12 образцов раком толстой кишки.

**Результаты.** В опухолевых тканях больных раком молочной железы экспрессия MUC1 регистрировалась во всех образцах. В опухолевых очагах рака толстой кишки мРНК MUC1 была выявлена только в половине образцов. Уровни мРНК MUC1 в образцах опухолевых очагов рака молочной железы и MUC1-позитивных образцах опухолей толстой кишки не отличались между собой.

**Выводы.** Представленные данные указывают, что при раке толстой кишки и, возможно, при других онкологических заболеваниях перед проведением иммунотерапии против MUC1 необходимо оценивать уровень его экспрессии в клетках опухоли.

*И.В. Гусев<sup>1</sup>, Н.Д. Олтаржевская<sup>1</sup>, М.А. Коровина<sup>1</sup>, А.В. Бойко<sup>1</sup>, Л.В. Демидова<sup>2</sup>, И.В. Дрошнев<sup>2</sup>,  
Е.А. Дунаева<sup>2</sup>, Н.А. Федоренко<sup>2</sup>, О.Б. Дубовецкая<sup>2</sup>*

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ГИДРОГЕЛЕВЫХ МАТЕРИАЛОВ**

#### **НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ С 5-ФТОРУРАЦИЛОМ**

#### **ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ И ПРЯМОЙ КИШКИ**

<sup>1</sup>ООО «КОЛТЕКС», Москва

<sup>2</sup>ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Москва

**Цель исследования.** Профилактика и лечение с целью радиосенсибилизации при проведении лучевой терапии злокачественных опухолей шейки матки и прямой кишки.

**Задачи исследования.** Определение эффективности использования высокоструктурированных гидрогелевых материалов (дисков) с 5-фторурацилом для местного подведения препарата при проведении лучевой терапии злокачественных опухолей шейки матки и прямой кишки.

**Материалы и методы.** В МНИОИ им. П.А. Герцена клинический опыт применения гидрогелевых дисков с 5-фторурацилом у больных раком шейки матки насчитывает 65 больных. Всем пациенткам при местном подведении 5-фторурацила провели курс предоперационного облучения без перерыва.

**Результаты.** Токсических проявлений со стороны кишечника не отмечено, лишь одна пациентка жаловалась на легкую тошноту. В контрольной группе явления энтероколита 1-2 степени развились у 27,4 % больных, лейкопении 2-й степени возникла у 8,9 %, а 4-й степени – у 2,2 % пациенток. У всех больных после местного подведения гидрогелевых салфеток с 5-фторурацилом отмечена выраженная резорбция опухоли. При анализе лекарственного патоморфоза после выполнения хирургического этапа лечения у 39,6 % пациенток отмечена IV его степень, у 49,2 % – III и у 11,2 % – II степень патоморфоза. В контрольной группе эти цифры составили 17,8, 48,9 и 26,7 % соответственно. У 6,6 % больных был определен лечебный патоморфоз лишь I степени. Данные материалы были использованы у 146 больных раком прямой кишки. Использование гидрогелевых материалов показало высокую эффективность для профилактики лучевых реакций. Лучевые реакции имели меньшую степень выраженности и развивались в более поздние сроки лечения, в основном к концу подведения искомого суммарно очаговых доз. У 84 % а больных к концу лечения развился лучевой ректит I степени выраженности, у 9 % – 2 степени. У 6 больных был недельный перерыв в лечении в связи с лучевой реакцией 3 степени выраженности, после подведения 2/3 дозы лучевой терапии. В течение недели на фоне проводимого лечения гидрогелевыми препаратами лучевые реакции были купированы, и облучение было продолжено до планируемых доз.

**Вывод.** В исследуемых группах больных, как при раке шейки матки, так и при раке прямой кишки, не было отмечено статистически достоверного усиления лучевых реакций со стороны слизистых. Таким образом, использование «Колгел-диск» с 5-фторурацилом в группе пациентов со злокачественными опухолями шейки матки и прямой кишки при агрессивной предоперационной лучевой терапии обеспечило: снижение общей токсичности лечения; усиление степени резорбции опухоли при меньших суммарных дозах 5-фторурацила; отсутствие усиления местных реакций; выполнение второго этапа лечения (операции) в запланированный срок. Проведенные клинические испытания демонстрируют необходимость и целесообразность использования высокоструктурированных гидрогелевых материалов на основе альгината натрия с 5-фторурацилом в качестве сопроводительного лечения для радиомодификации при лучевой терапии у больных раком шейки матки и прямой кишки.

*А.М. Дейчман*

### ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ПОВТОРОВ, СТРУКТУРЫ И ТИПОВ АКТИВНОСТИ ГЕНОМА ПРИ ОНКОГЕНЕЗЕ

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

Последовательности повторов – лабильные структуры, способствующие процессам изменения, обмена и переноса отдельных нуклеотидов и их последовательностей. Пунктуация повторами генов/генома задает рамки реальной/потенциальной активности генома (генетической/эпигенетической). Участвуя в связанных с синтезом ДНК/РНК процессах (различных типов репликации, репарации, рекомбинации, транспозиции, транскрипции и т.д.), повторы преобразуют исходные и создают новые повторы (повтор1→вариант-повтора1/повтор2; нетриплетный→ триплетный повтор, некодирующий→кодирующий); преобразования касаются и окружающих последовательностей.

Пути появления и амплификации повторов во многом не известны. Одним из механизмов синтеза олигонуклеотидов вне ядра (мини/микро-сателлит-подобных/уникальных) может быть гипотетическая варибельная Поэпитопная Обратная Трансляция (вПОТ) белкового эпитопа, описание которой можно найти в работах на сайте ([www.amdeich-var-reverse-translation.ru](http://www.amdeich-var-reverse-translation.ru)). Такие повторы, выполняя регуляторные и пластические функции в геноме ядра/(митохондрий) соматических (включая иммунные), стволовых и герминативных клеток, способны запускать адаптивные/эволюционно-значимые процессы (в том числе, генетического поиска), наиболее мощно и ожидаемо проявляемые при онкогенезе.

*И.Ф. Демин, Е.А. Волосникова, Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко*

### ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ КОНЬЮГАТОВ рЧФНО-АЛЬФА С БИСФОСФОНАТАМИ

*ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР», Бердск*

**Актуальность.** Одна из задач онкотерапии – ингибирование роста опухолевых метастазов в костную ткань. Известно, что рекомбинантный фактор некроза опухолей альфа человека (рчФНО-α) обладает мощным противоопухолевым потенциалом. Перспективным средством таргетной доставки лекарств в область костных метастазов являются бисфосфонаты в силу их высокой аффинности к гидроксипатиту кости.

**Цель работы.** Получение и исследование свойств конъюгатов рчФНО-α с бисфосфонатом алендроновой кислотой (АЛН).

**Материалы и методы.** Конъюгирование рчФНО-α с АЛН проводили с помощью бифункциональных сшивающих агентов (глутаровый альдегид, EDC, Sulfo-SMCC).

**Результаты.** Электрофоретический анализ полученных конъюгатов в 12%-ном ПААГ показал наличие в образцах белка с молекулярной массой ~16700Да, соответствующей молекулярной массе рчФНО-α в мономерной форме. Колориметрический анализ подтвердил присутствие в образцах фосфатных остатков АЛН. Цитолитическая активность конъюгата рчФНО-α с АЛН, определенная в культуре клеток L-929, составляла от  $4,4 \cdot 10^7$  до  $7,9 \cdot 10^7$  МЕ/мг (для исходного белка –  $1 \cdot 10^8$  МЕ/мг), что свидетельствует о сохранности биологических свойств рчФНО-α в составе конъюгата.

**Выводы.** Таким образом, конъюгаты рчФНО-α с алендроновой кислотой обладают выраженной цитолитической активностью и могут быть использованы для дальнейшей разработки на их основе противоопухолевого препарата адресного действия.

*М.В. Дмитриева, Н.А. Оборотова, Ю.В. Родионова*

### СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ С БОРХЛОРИНОМ

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Метод получения липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) существенным образом влияет на такие важнейшие показатели качества препарата как размер везикул, эффективность включения действующего вещества в везикулы, pH, стабильность при хранении и др.

**Задача исследования.** Сравнительное изучение способов получения ЛЛФ борхлорина.

**Материалы и методы.** Липосомальную дисперсию получали гидратацией липидной пленки, упаренной из хлороформного раствора компонентов ЛЛФ – борхлорина (ИНЭОС им. Несмеянова), фосфатидилхолина (E PC S Lipoid GmbH, Германия), холестерина (Sigma, Япония) и дистеароилфосфатидилэтаноламин-ПЭГ-2000 (Lipoid GmbH, Германия) на роторном испарителе (Büchi, Швейцария). Полученную дисперсию фильтровали через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» N66 с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм (ООО «Палл Евразия», Россия) с использованием экструдера Lipex™ (Northern Lipids, Канада) и делили на равные объемы (по 30 мл). Для измельчения липосом использовали: 1. экструзию (дисперсию последовательно экструдировали через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» N66 с диаметром пор 0,22 мкм (5 раз) и поливинилиденфторидовые мембранные фильтры «Durapore» (Millipore, Ирландия) с диаметром пор 0,1 мкм (2 раза), 2. обработку УЗ (дисперсию озвучивали в УЗ-ванне Transsonic T310 (Elma, Германия) с частотой 20 кГц в течение 1 – 60 мин). Каждый метод оценивали по показателям качества получаемых дисперсий: диаметр везикул (d) и эффективность включения (ЭВ) борхлорина в липосомы.

**Результаты и вывод.** Измельченные УЗ в течение 30 мин липосомы имели  $d = 194 \pm 16$  нм, который сохранялся в течение 2 суток хранения при  $+3$   $\pm$   $+5$  °С. Дальнейшее измельчение липосом еще в течение 30 мин не привело к существенному уменьшению d, значение которого находилось на уровне  $192 \pm 5$  нм. ЭВ борхлорина в при УЗ воздействии снижалась от исходного значения после 30 мин озвучивания до 95 %, а после 60 мин – до 93 %. При использовании экструзии с использованием фильтров «Pall» ЭВ составила 98 %, а d –  $185 \pm 10$  нм, который сохранялся в течение 2 суток хранения. При последующем измельчении с фильтром «Nuclepore» наблюдали резкое снижение ЭВ до 93 %. Средний d липосом составил  $180 \pm 5$  нм, однако через 2 суток хранения увеличился до  $236 \pm 8$  нм. Таким образом, в результате сравнения методов изготовления ЛЛФ борхлорина оптимальные показатели качества получены при экструзии с использованием фильтра «Pall» ( $d = 0,22$  мкм). В этом случае отмечается сохранение высокого уровня включения борхлорина в везикулы и устойчивый в процессе хранения размер липосом.

*И.Н. Дружкова, Н.И. Игнатова, Т.Ф. Сергеева, В.В. Дуденкова, М.В. Ширманова, Е.В. Загайнова*  
**НОВЫЙ ПОДХОД В ИССЛЕДОВАНИИ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА МОДЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ**

*ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Н. Новгород*

**Актуальность.** Известно, что опухолевые сфероиды более адекватно отражают поведение опухолевых клеток по сравнению с монослойными культурами.

**Цель работы.** Разработка нового подхода к тестированию лекарственной чувствительности опухолевых клеток с использованием модели опухолевых сфероидов.

**Материалы и методы.** В работе использованы клеточные линии колоректального рака человека НСТ116 и НТ29. Исследовано действие химиопрепаратов иринотекан, оксалиплатин и 5-фторурацил. Лекарственную чувствительность оценивали с помощью МТТ-теста, анализа морфологической структуры и размеров сфероидов.

**Результаты.** Установлено, что чувствительность монослойных культур НСТ116 и НТ29 к разным химиопрепаратам отличается. При этом чувствительность клеток линии НСТ116 выше, чем НТ29. При проведении исследований на опухолевых сфероидах выявлено, что клетки наиболее чувствительны к иринотекану. При добавлении иринотекана в однократной полудлетальной дозе видны резкие изменения морфологии сфероидов, при этом клетки линии НТ29 оказались более чувствительными, чем НСТ116. В целом, при формировании сфероидов чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам была ниже по сравнению с монослойной культурой.

**Заключение.** Таким образом, нами разработана оригинальная методика оценки химиочувствительности опухолевых клеток на модели опухолевых сфероидов.

*Н.О. Дугин<sup>1</sup>, Р.А. Новиков<sup>2</sup>, А.Р. Мехтиева<sup>1</sup>, Г.В. Пономарев<sup>1</sup>*

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 13<sup>1</sup>-,15<sup>2</sup>-,17<sup>3</sup>-КАРБОКСАМИДОВ ПРИРОДНЫХ ХЛОРИНОВ**

<sup>1</sup>ИБМХ, Москва

<sup>2</sup>ИМБ РАН, Москва

В данной работе были исследованы новые производные 13<sup>1</sup>-,15<sup>2</sup>-,17<sup>3</sup>-карбоксамидов хлорина и метилфеофорбида *a*. Был разработан метод получения смешанных мицелл синтезированных производных макроциклов с фосфатидилхолином (ФХ). Наиболее существенные изменения спектральных характеристик наблюдались для фосфолипидных мицелл, содержащих 17<sup>3</sup>-карбоксамиды. В составе смешанных мицелл макроциклы образовывали самоассоциаты. Форма и размеры смешанных мицелл, а также полидисперсность и стабильность частиц исследованы различными методами. При взаимодействии смешанных мицелл фосфатидилхолина и конъюгатов с клетками МСF-7 наиболее активными оказались 17<sup>3</sup>-гексадециловые производные пиррофеофорбида с молярным соотношением конъюгата/ФХ равным 1:7 (12,5 моль%). Клеточный захват и их интернализация осуществлялись посредством клатрин-зависимого эндоцитоза и диффузии. Мицеллы локализовались в везикулах эндоплазматического ретикулума и в лизосомах, распространенность каждого из этих механизмов зависела от размера липосомы и структуры конъюгата. Исследуемые фотоэффекты в культивируемых клетках зависели от активности вещества, интенсивности и времени лазерного облучения. Таким образом, новые липофильные 13<sup>1</sup>-, 15<sup>2</sup>-, 17<sup>3</sup>-карбоксамиды и их комплексы с фосфолипидами могут быть использованы для направленной доставки макроциклов в опухолевые клетки при разработке новых методов фотодинамической терапии.

*Н.О. Дугин, Д.К. Шишова, А.Ю. Мишарин, А.В. Веселовский, Г.В. Пономарев*

**НОВЫЙ СТЕРОИДНЫЙ КОНЬЮГАТ ПИРОФЕОФОРБИДА *a***

*ИБМХ, Москва*

Рак простаты характеризуется повышенной активностью андрогенового рецептора (AR), обусловленной его мутациями и сниженной лигандной специфичностью. Стероидные антиандрогены обладают сродством к AR, характеризуются повышенным захватом андроген-чувствительными клетками и исследуются в качестве потенциальных противораковых препаратов.

В работе проведены дизайн, синтез и тестирование нового производного пиррофеофорбида *a*, конъюгированного с фрагментом стероидного антиандрогена – 17<sup>3</sup>(3β,17β-дигидрокси)регн-5-ен-21-ил)-окси)пиррофеофорбида *a* (ДППФ). ДППФ получен 4-х стадийным синтезом из этил-3β,17β-дигидрокси)регн-5-ен-21-оата и пиррофеофорбида *a*. Исследованы спектральные характеристики ДППФ; рассчитаны низкоэнергетические конформации ДППФ и оценено взаимное влияние фрагментов в конъюгате; построена и проанализирована модель комплекса лиганд-связывающего домена AR с ДППФ, в которой стероидный фрагмент ДППФ занимал положение тестостерона; исследовано накопление ДППФ в клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3.

Результаты свидетельствуют, что ДППФ и другие химерные конъюгаты макрогетероциклов могут применяться в качестве противораковых агентов и специфичных сенсibilизаторов для ФДТ.



*Г.Г. Евсеев, М.А. Барышникова, Г.Б. Лапа*

### СИНТЕЗ НОВЫХ АМИДОВ 1-МЕТИЛ-3-АМИНОИЗОХИНОЛИНА, ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ПОИСК ИХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ IN SILICO И IN VITRO

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Задачи исследования.** Провести синтез и первичный скрининг на селективную цитотоксическую активность новых, патентно чистых производных 1-мети-3-аминохинолина. Определить наиболее вероятные молекулярные мишени отобранных соединений, для увеличения селективности в цитотоксической активности и оптимизации физико-химических свойств, необходимых для доклинических испытаний (стабильность, растворимость и т.п.).

**Материалы и методы.** Виртуальным скринингом в программах PASS-online и molinsiration были сформированы комбинаторные библиотеки, на основе амидов 3- или 4-аминобензойных кислот и 1-мети-3-аминохинолина с наивысшими коэффициентами ингибиторов протеинкиназ. Для скрининга селективной цитотоксичности (при 100, 50 и 10  $\mu\text{M}$ ) были использованы линии клеток: A498, A549, F9, HCT-116, Jurkat, LNCap, MCF-7, Mel Kor, Mel Mtp, Raji, RT-112, SH-SY5Y, SKBR-3. Для поиска in silico вероятных мишеней использовали PASS-online. Изучение вероятных способов взаимодействия новых соединений с протеин киназами провели в пакете программ AutoDockTools-Vina. Ингибирование связывания меченного  $^{31}\text{P}$ -АТФ с протеин киназами тестировали при концентрации веществ 50  $\mu\text{M}$ .

**Результаты и выводы.** Синтетическая стратегия создания библиотеки была подобрана таким образом, чтобы ароматические аминогруппы служили точками, по которым шло комбинаторное наращивание этой библиотеки. В первичном скрининге селективная цитотоксичность была найдена на клеточных линиях A549, HCT-116, Jurkat и MCF-7 для соединений, содержащих в амидной части 1-мети-3-аминохинолина: 4(N-метил-пиперазинилметилено)-бензамид (LGB-017), 4-[(4-хлорбензил)амино]-бензамид (EGG-005), 4-[(1-этил-1H-пиразол-4-ил)метил]амино-бензамид (EGG-016). Выживаемость клеток при 50  $\mu\text{M}$  составила от 24 до 49%. Поскольку для отобранных линий мутация CDKN2A гена является общей, то вероятно ряд киназ, отвечающих за клеточный цикл (CDK2, CDK9, ABL, AuroraA и др.), могли быть активированы. Поиск вероятной мишени in silico (докинг) среди этих киназ показал, что LGB-017 и EGG-005 могли бы связываться с ABL, CDK9, PDGFRa с коэффициентами -8.6 Ккал/мол и ниже. Однако анализ конформаций в активном центре обнаружил, что эти соединения связываются не специфично и они малоприспособлены для дальнейшей разработки в направлении киназных ингибиторов. Более того, анализ ингибирования связывания киназами (ABL, AuroraA, CDK2, CDK9, PDGFRa, MELK, MLK1) меченного  $^{31}\text{P}$ -АТФ in vitro подтвердил, что LGB-017 и амиды 1-мети-3-аминохинолина очень слабо ингибируют перечисленные киназы.

*Н.П. Ермакова<sup>1</sup>, А.П. Бонарцев<sup>2,3</sup>, О.И. Коняева<sup>1</sup>, Н.Ю. Кульбачевская<sup>1</sup>, В.А. Чалей<sup>1</sup>, И.Б. Меркулова<sup>1</sup>, Т.В. Абрамова<sup>1</sup>, А.А. Сергеев<sup>1</sup>, А.Л. Зернов<sup>3</sup>, С.Г. Яковлев<sup>3</sup>, Г.А. Бонарцева<sup>3</sup>, К.В. Шайтан<sup>2</sup>, В.М. Бухман<sup>1</sup>*

### ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПОЛИМЕРНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПАКЛИТАКСЕЛА

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

**Цель исследования.** Изучение «субхронической» токсичности и алергогенности биополимерной лекарственной формы паклитаксела (БЛФП) для лечения опухолевых заболеваний.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на 110 неинбредных крысах самцах, на 60 морских свинках. БЛФП – 5% суспензия биополимерных микрочастиц в физиологическом растворе хлористого натрия. Микрочастицы получены методом пьезоэлектрического распыления на биологическом факультете МГУ. Содержание лекарственной субстанции паклитаксела (ПКЛ) в микрочастицах –  $10 \pm 1\%$ . БЛФП вводили крысам 3-кратно внутрибрюшинно ежедневно в 5% концентрации в суммарных дозах соответствующих  $\frac{1}{2}$  МПД, МПД и ЛД<sub>50</sub>, полученных при изучении «острой» токсичности.

**Результаты.** БЛФП во всех исследованных дозах на 1 сутки после 3-кратного введения вызывает экссудативный перитонит, с развитием выраженности процесса к 30 суткам наблюдения и не полным восстановлением к концу опыта (100 сутки). БЛФП вызывает гастроинтестинальную токсичность: диарею, понижение массы тела и дозозависимые деструктивные и дистрофические изменения в тонком кишечнике. Препарат оказывает токсическое действие на периферическую кровь животных, вызывая изменения общего количества лейкоцитов, тромбоцитов и эозинофилов. Морфологически установлена необратимая гипоплазия клеток костного мозга, умеренные деструктивные и дистрофические изменения клеток селезенки. БЛФП вызывает изменения в почках, проявляющиеся повышением количества мочевины в сыворотке крови, изменением суточного диуреза, увеличением относительной массы почек, деструктивными и дистрофическими изменениями в почках. БЛФП оказывает действие на функциональное состояние печени, вызывая дозозависимое понижение уровня альбумина и общего белка в сыворотке крови животных. Морфологически установлено: увеличение относительной массы печени и умеренные воспалительные, деструктивные и дистрофические изменения. БЛФП не вызывает изменений со стороны сердечно-сосудистой системы животных. БЛФП обладает алергизирующими свойствами. Препарат обладает выраженными ремулятивными свойствами.

**Вывод.** На основании полученных результатов дальнейшее изучение БЛФП при внутрибрюшинном применении не рекомендовано.

*Р. М. Жабина, А. В. Мешечкин, Ю. В. Суворова*

### **КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ И РЕЦИДИВНЫХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

*ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург*

**Цель исследования.** Улучшение результатов лечения больных первичными опухолями головного мозга путем оптимизации лечебно-диагностического процесса.

**Методы и материалы.** Наблюдались и получали лечение 402 больных первичными опухолями головного мозга. Лечение: операция, лучевая и полихимиотерапия. Область лучевого воздействия включала весь объем опухоли и не менее 1,5 – 2 см перитуморальной зоны. Облучение проводилось ежедневно, 5 раз в неделю, СОД 60 Гр. Лучевая терапия сочеталась химиотерапией. В режиме монокимиотерапии использовали: гидран, кармустин, мустофоран, темодал по принятым схемам. Диспансерное наблюдение 1 раз в 1,5-2мес. С 2001 года больным с рецидивами глиальных опухолей стали проводить церебральную ангиографию с интрацеребральным введением химиопрепаратов, с лечебной и радиосенсибилизационной целью и последующей лучевой терапией. За сутки до лучевой терапии выполнялась церебральная ангиография с интрацеребральным введением химиопрепарата кармустин (1/2 дозы) с последующим системным введением оставшейся 1/2 дозы препарата. Облучение больных с рецидивом анапластической астроцитомы GrIII, глиобластомы GrIV или с мультиформной глиобластомой головного мозга в возрасте < 55 лет, индексом Karnofsky > 70 %, РОД 2Гр, проводили ежедневно, 5 дней в неделю. Облучение до СОД 40 Гр локально на область очаговых изменений. Далее больные получали курсы МХТ и симптоматическую терапию. По данному протоколу было пролечено 24больных.

**Выводы.** Положительный эффект при комбинированном лечении глиальных первичных и рецидивных опухолей головного мозга, по нашему мнению, зависел от соблюдения алгоритма диагностических и лечебных мероприятий. Получено повышение эффективности хирургического и химиолучевого лечения больных глиальными опухолями головного мозга. У 2 % больных глиобластомой головного мозга отмечена 5-летняя выживаемость.

*Р. М. Жабина, А. В. Мешечкин, Л. И. Корытова*

### **КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ РЕЦИДИВОВ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

*ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург*

**Актуальность.** Лечение больных злокачественными опухолями головного мозга (ОГМ) является одной из самых сложных проблем современной медицины. Применение лучевой терапии (ЛТ) и химиотерапевтического (ХТ) лечения после реопераций ограничено или не используется вовсе.

**Цель исследования.** Оценить эффективность комбинированного лечения больных с рецидивами ОГМ. **Материалы и методы.** Работа основана на анализе результатов комбинированного лечения 52 пациентов с рецидивами первичных злокачественных ОГМ (глиобластома (Gr4) – 24 пациента, анапластическая астроцитомы (Gr 3) – 28 пациентов). Рецидив опухоли подтверждали с помощью повторной операции, позитронно-эмиссионной и магнитно-резонансной томографии. В комплекс лечебных мероприятий при рецидивах ОГМ входили: повторное оперативное вмешательство, ХТ и ЛТ. Суммарные очаговые дозы при первичном облучении составили 50 – 60 Гр. При рецидивах ОГМ все пациенты в нашем Центре получали ЛТ, 96 % из них – ЛТ и ХТ. Лишь у 56 % больных было проведено комбинированное лечение, включающее операцию, ЛТ и ХТ. При повторной ЛТ суммарные очаговые дозы (СОД экв.) варьировали от 30 до 40 Гр. При этом СОД 30 Гр получили 14 пациентов, 40 Гр – 38 пациентов, ЛТ проводилась в сочетании с ХТ в стандартных дозах, при этом темодал использовался у 34 пациентов, ломустин с винкристином – у 13 пациентов, мустофоран – у 5 пациентов. **Результаты.** Лучевая терапия была проведена всем больным в полном объеме, без перерывов в лечении. Переносимость лечения была удовлетворительной. После первичного лечения медиана времени до рецидива ОГМ у больных с анапластическими астроцитомами в среднем составила 61 мес., а при глиобластомах – 11 мес. Средняя продолжительность жизни у больных с АА после повторного лечения ОГМ составила 29 мес. У больных с глиобластомами средняя продолжительность жизни после рецидива составила 10 мес.

**Выводы.** Применение повторного химиолучевого лечения при рецидивах ОГМ повышает выживаемость больных данной категории.

О.С. Жукова<sup>1</sup>, М.В. Киселевский<sup>1</sup>, Л.В. Фетисова<sup>1</sup>, Б.З. Елецкая<sup>2</sup>, А.О. Денисова<sup>2</sup>, М.Я. Берзина<sup>2</sup>, А.Л. Каюшин<sup>2</sup>, И.Д. Константинова<sup>2</sup>

### ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ХИРАЛЬНЫМИ АМИНОКИСЛОТАМИ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

<sup>2</sup>ФГБНУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

**Актуальность.** Лечение острых лимфобластных лейкозов у детей является одной из успешных областей химиотерапии злокачественных опухолей. Однако частота рецидивов составляет порядка 20 % с плохим прогнозом. Новым эффективным препаратом для лечения рецидивирующей и устойчивой Т-клеточной форм ОЛЛ является неларабин (арабинофуранозилгуанин). Представляет практический интерес поиск новых активных аналогов неларабина для создания на их основе отечественного препарата.

**Цель исследования.** Оценить цитотоксическую активность двух серий модифицированных нуклеозидов: ряда D-арабинозы, содержащего хиральные аминокислоты в C6 положении пуринового гетероциклического основания, а также аналогов 3'-дезоксаденозина. Проанализировать связь структуры и цитотоксической активности.

**Материалы и методы.** Цитотоксическую активность оценивали по выживаемости клеток линии U937 с помощью стандартного МТТ-теста. Препаратом сравнения служил препарат неларабин. Активность соединений сравнивали по стандартному показателю IC50.

**Результаты.** Из 8 нуклеозидов первой серии активность показана для C6-L-серинового аналога (1) с атомом хлора в C2 положении (IC50= 16 мкМ). Из 3 аналогов второй серии активность обнаружена у производного с атомом фтора в C2 положении (2) (IC50=14 мкМ). Следовательно, введение атомов хлора или фтора в C2 положение и введение L-серина в C6 положение пуринового гетероциклического основания, использование D-арабинозы или 3'-деоксирибозы в качестве углеводного остатка приводила к появлению цитотоксической активности в обоих рядах соединений. Цитотоксическая активность соединений 1 или 2 несколько уступала неларабину (синтезирован в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН, IC50=3 мкМ).

**Выводы.** Целесообразно продолжить поиск новых модифицированных нуклеозидов, не уступающих по активности неларабину и имеющих более низкую токсичность.

Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, Д.В. Табаков, А.А. Борунова, З.Г. Кадагидзе

### ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ CD8 ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОНОРОВ

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

**Цель исследования.** Изучение фенотипической структуры CD8 лимфоцитов периферической крови (ПК) здоровых доноров, опосредующей функциональную цитотоксическую активность.

**Материалы и методы.** В качестве клеток-мишеней использовали лимфоциты (ПК) 45 здоровых доноров, из которых 36 женщин и 9 мужчин. Анализ субпопуляционной структуры осуществляли с помощью многопараметровой проточной цитометрии. Для изучения цитотоксической состоятельности CD8 эффекторных лимфоцитов использовали коммерческую тест-систему (BD Biosciences).

**Результаты.** Анализ гистограмм распределения антиген-позитивных клеток показал, что при гейтировании клеток по параметрам бокового/малоуглового светорассеяния SSC vs CD45 популяция лимфоидных CD8 лимфоцитов составляет 34,8±1,9 % антиген-положительных клеток и колеблется от 26,0 до 50,5 %. Выявлено, что в анализируемой группе доноров 66,9 % CD8+ лимфоцитов являются клетками с высокой плотностью антигена, а 33,1 % CD8+ лимфоцитов обладали средней/слабой степенью насыщения этим белком. Количество антиген-положительных клеток с фенотипом CD8+CD3+ представлено на 27,3±2,4 %, а клетки с фенотипом CD8+CD3- определяются на 7,5±1,5 % CD45+лимфоцитов ПК здоровых лиц. Анализ структуры CD8+лимфоцитов показал, что на долю CD8+CD3+CD45+ клеток приходится 76,2 %, а клетки с фенотипом CD8+CD3-CD45+ составляют 23,8 % среди CD8+лимфоцитов, что сопоставимо с данными, полученными при гистограммном анализе образцов в зависимости от степени экспрессии белков CD8+high и CD8+medium/low. Выявлен высокий уровень корреляции (r=0,54) клеток с фенотипами CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>medium/lowCD16<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> в ПК здоровых лиц – 7,5±1,2 % и 6,4±1,3 % соответственно. Был проведен анализ распределения внутриклеточного белка перфорина в CD8 клетках с различным уровнем экспрессии антигена. Обнаружено, что у здоровых доноров перфорин+ субпопуляцией являются клетки со слабой экспрессией CD8 белка.

**Вывод.** Таким образом, по степени экспрессии поверхностного антигена на мембране CD8<sup>+</sup> лимфоцитов ПК возможно выявление различных субпопуляций, в том числе специфических цитотоксических Т-клеток.

*Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, А.А. Борунова, Д.В. Табаков, И.И. Бокин, И.В. Паниченко, М.В. Савостикова, И.В. Самойленко, В.Т. Циклаури, Ш.Г. Хакимова, З.Г. Кадагидзе*

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ, И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

**Цель исследования.** Провести сравнительное изучение структуры лимфоидных клеток периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у онкологических больных.

**Материалы и методы.** Исследованы образцы опухолевой ткани больных раком яичников, меланомы, раком слизистой оболочки полости рта, раком молочной железы, полученные интраоперационно или путем сгубиопсии. Для получения клеточных суспензий проводили фрагментацию ткани опухолей с использованием Medimachine (BD Biosciences). Все полученные образцы подвергались цитоморфологическому контролю. Структуру субпопуляций клеток оценивали по связыванию с моноклональными антителами различной специфичности методом многопараметровой проточной цитометрии.

**Результаты и выводы.** Оценка образцов опухолевых клеток показала, что содержание лимфоидных клеток (TIL) с фенотипом CD45<sup>+</sup> в полученных суспензиях не превышает 0,97±0,32 %. При сравнении уровня линейных популяций лимфоцитов (Т-В-НК) обнаружено, что в структуре TIL показатели CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> значительно превышают соответствующие популяции периферической крови – 89±3,5 % и 64,3±4,2 % соотв. Количество НК-клеток с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, напротив оказалось резко снижено по сравнению с показателями периферической крови – 4,8±1,1 % и 21,5±1,4 % соответственно. При сравнении цитотоксического потенциала НК-клеток в периферической крови и в ткани, оцениваемого по содержанию внутриклеточного перфорина, выявлено отсутствие цитотоксической активности НК-клеток в структуре TIL. Аналогичным оказалось соотношение В-лимфоцитов – 2,75±0,3 и 6,8±0,4 %.

*С.И. Заброта, Е.А. Маслюкова, Л.И. Корытова, К.М. Пожарисский, Г.А. Раскин, О.В. Корытов*

**RANK–МАРКЕР (РЕЦЕПТОР АКТИВАЦИИ НУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА – kB) У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*ФГБУ «РНЦРХТ», Санкт-Петербург*

**Цель работы.** Исследование экспрессии RANK в опухолевых клетках у больных РМЖ.

**Материалы и методы.** С целью изучения уровня RANK проводилось иммуногистохимическое исследование 83 пациентки с РМЖ (T2-4N0-3M0), которое выполнялось по стандартному протоколу на срезах биопсийного материала.

**Результаты.** Оценка уровня RANK осуществлялась путем подсчета числа позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток. Экспрессия более чем в 5 % клеток расценивалась как высокая, менее 5 % – низкая. По уровню экспрессии больные были разделены на две группы: первая – с высоким RANK (high), вторая группа – с низкой экспрессией RANK (low). В группу RANK (high) вошли 39, в группу RANK (low) – 44 пациенток. Не было отмечено каких-либо достоверных различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, категории Т и индекса Ki-67 в отношении экспрессии OPG. В группе с положительным эстроген прогестероновыми рецепторами OPG(high) встречались достоверно чаще, чем в группе с отрицательными рецепторами, p<0,05. У больных с высокой экспрессией RANK время до прогрессирования и выживаемость были достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с RANK (low).

**Вывод.** RANK в клетках опухоли РМЖ – дополнительный прогностический маркер.

*С.И. Заброта, Е.А. Маслюкова, Л.И. Корытова, К.М. Пожарисский, Г.А. Раскин, О.В. Корытов*

**ЭКСПРЕССИЯ ОСТЕОПРОТЕГЕРИНА (OPG) В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ)**

*ФГБУ «РНЦРХТ», Санкт-Петербург*

**Цель исследования.** Исследование экспрессии OPG в опухолевых клетках у больных РМЖ.

**Материалы и методы.** С целью изучения уровня OPG проводилось иммуногистохимическое исследование 83 пациентки с РМЖ (T2-4N0-3M0), которое выполнялось по стандартному протоколу на срезах биопсийного материала. Оценка уровня OPG осуществлялась путем подсчета числа позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток. Экспрессия более чем в 50 % клеток расценивалась как высокая, менее 50 % – низкая.

**Результаты.** По уровню экспрессии больные были разделены на две группы: первая – с высоким OPG (high), вторая группа – с низкой экспрессией OPG (low). В группу OPG(high) вошли 47, в группу OPG (low) – 36 пациенток. Не было отмечено каких-либо достоверных различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, категории Т и индекса Ki-67 в отношении экспрессии OPG. В группе с положительным эстроген прогестероновыми рецепторами OPG(high) встречались достоверно чаще, чем в группе с отрицательными рецепторами, p<0,05. У больных с высокой экспрессией OPG время до прогрессирования и выживаемость были достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с OPG (low).

**Вывод.** OPG в клетках опухоли РМЖ – дополнительный прогностический маркер.

М.П. Завелевич, Л.М. Куява, А.А. Фильченков

### ГЕРОГЕННОСТЬ ОТВЕТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ В-КЛЕТОЧНЫМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ *IN VITRO* НА ИНДУКТОРЫ АПОПТОЗА

ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

**Задачи исследования.** В-клеточный лимфолейкоз (В-ХЛЛ) представляет собой клинически гетерогенное заболевание. Неоднородным является и ответ на терапию цитотоксическими химиопрепаратами, что приводит к существенным индивидуальным различиям клинического ответа на терапию В-ХЛЛ. Задача исследования заключалась в анализе цитотоксичности и индукции апоптоза в первичных культурах мононуклеаров периферической крови больных В-ХЛЛ при действии цитотоксических средств с различным механизмом действия.

**Материалы и методы.** Исследования проводили в первичных культурах клеток периферической крови 26 больных В-ХЛЛ, не экспрессирующих CD38. Анализировали также 2 культуры, полученные из периферической крови больных с лимфоцитозом без признаков моноклонности. Гибель клеток оценивали в тесте с трипановым синим, а апоптоз – методом проточной цитометрии клеток, окрашенных пропидия иодидом. Определяли значения индекса цитотоксичности и апоптотического индекса в культурах при действии вепезида или флударабина фосфата. Для статистического анализа использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

**Результаты и выводы.** Показана значительная гетерогенность цитотоксического ответа и индукции апоптоза *in vitro* при действии вепезида (5 мкмоль/л, 18 ч) или флударабина фосфата (10 мкмоль/л, 48 ч), причем цитотоксический эффект при действии этих препаратов превалирует над индукцией апоптоза. В культурах мононуклеаров периферической крови больных, у которых не была подтверждена моноклонность лимфопрототипного процесса, при действии исследуемых препаратов не выявляли ни гибели клеток, ни индуцированного апоптоза. Средние значения индекса цитотоксичности варьировали от 1,05 до 2,56, а апоптотического индекса – от 0,15 до 0,37. Разброс этих показателей был весьма значительным, что свидетельствует об исключительно индивидуальном характере чувствительности клеток различных больных В-ХЛЛ. При этом в отдельных случаях показатели цитотоксичности или индукции апоптоза были гораздо выше средних значений. Индуцированная цитотоксическими химиопрепаратами гибель злокачественных лимфоидных клеток при В-ХЛЛ не всегда базируется на механизмах апоптоза, что согласуется с данными о дефектности систем реализации апоптоза в этих клетках.

М.Т. Зангиева, М.А. Барышников, Е.В. Игнатъева, В.С. Косоруков, А.А. Матюшин, А.Ю. Барышников

### РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, НАГРУЖЕННЫХ ДОКСОРУБИЦИНОМ

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** Активную доставку в опухолевую клетку обеспечивают прикрепленные к ним МКА или лиганды, которые связываются с опухолевыми клетками и не взаимодействуют со здоровыми тканями. С помощью присоединения лиганд к поверхности липосомы есть возможность селективно доставлять препарат непосредственно к опухолевой клетке. В качестве лиганд используют МКА, одноцепочечные антитела, пенетрирующие в клетку пептиды. Стерически стабилизированные иммунолипосомы оказывают наибольший цитотоксический эффект, чем обычные липосомы. Одним из объектов, активно изучаемых в последние годы в качестве новой противоопухолевой мишени, является рецептор эпидермального фактора роста (EGFR).

**Цель работы.** Разработать иммунолипосомальные конструкции, нагруженные доксорубицином, направленные против HER2-рецептора.

**Материалы и методы.** Яичный фосфатидилхолин (PC), полиэтиленгликоль (mPEG-2000-DSPE) фирмы Lipoid, холестерин (Chol) (Sigma), pNp-PEG<sub>3000</sub>-липид, Доксорубицина гидрохлорид субстанция (Докс) серия 010809 ФСП 42-2570-06 (ОАО ОНОПБ, Россия), гуманизированные моноклональные анти-Her2/neu антитела (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», лаборатория трансгенных препаратов).

**Результаты.** Иммунолипосомы получали методом обращения фаз. Липидную пленку гидратировали 125 мМ сульфата аммония. Для конъюгации к поверхности липосом векторных лигандов в состав липосом вводили п-нитрофениловый эфир полиэтиленгликоль-липидного конъюгата, встраиваемого в липосомы за счет липидной составляющей. Очистку иммунолипосомальных дисперсий от не включившегося в везикулы цитостатика и не присоединившихся МКА проводили методом гель-фильтрации. На выходе из колонки получали фракцию очищенных иммунолипосом, которую затем подвергали спектрофотометрическому анализу. Содержание цитостатика в иммунолипосомальной конструкции проводили с использованием рабочего стандартного образца доксорубицина при длине волны 252±2 нм. С помощью реакции иммунофлуоресценции показана способность иммунолипосом специфически связываться с рецептором HER2, экспрессированным на клетках линии SK-BR-3.

**Вывод.** Разработана технология получения иммунолипосом с высокой (до 80 %) степенью загрузки препарата.

*М.К. Иванов<sup>2</sup>, С.Е. Титов<sup>1,2</sup>, Е.В. Карпинская<sup>3</sup>, С.П. Шевченко<sup>3</sup>,  
М.К. Тагирова<sup>4</sup>, И.Ф. Жимулев<sup>1</sup>, Н.Н. Колесников<sup>1</sup>*

### **ВОЗМОЖНОСТИ ТЕХНОЛОГИИ NANOSTRING**

#### **ДЛЯ МИКРОРНК-ПРОФИЛИРОВАНИЯ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

<sup>1</sup>ИМКБ СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>ЗАО "Вектор-Бест", Кольцово

<sup>3</sup>МБУЗ г. Новосибирска ГКБ №1, Новосибирск

<sup>4</sup>ОСП НИКИ педиатрии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

**Задача исследования.** Оценка возможностей технологии NanoString™ для выявления микроРНК-биомаркеров разных типов опухолей щитовидной железы (ЩЖ), а также сравнение получаемых оценок с результатами, полученными методом ОТ-ПЦР-РВ (обратная транскрипция и ПЦР с детекцией в реальном времени).

**Материалы и методы.** В образцах ткани разных типов новообразований ЩЖ, хирургически удаленных у 8 пациентов (контроль – прилежащая условно-нормальная ткань), одновременно оценивали содержание 800 микроРНК при помощи NanoString.

**Результаты и выводы.** Для 249 микроРНК была показана достоверная экспрессия в тех или иных пробах. Для 103 микроРНК погрешность измерения не превышала 50 %. Достоверным считали изменение содержания таких микроРНК в опухоли относительно контроля более чем в 3 раза. Для 39 из них было показано повышение содержания как минимум в одной опухоли, для 27 – снижение. Содержание ни одной микроРНК не повышалось при зобе. Содержание 3 микроРНК всегда было повышено при раке: miR-221, -222 и -34. Для 16 микроРНК содержание в этих же пробах было оценено при помощи ОТ-ПЦР-РВ. Результаты, полученные при помощи двух методов, в целом продемонстрировали высокую корреляцию, однако некоторые микроРНК неэффективно выявлялись одним из них, хотя надежно определялись вторым. Некоторые микроРНК, выявленные методом NanoString в ходе эксперимента, оказались перспективными либо как маркеры для подтверждения злокачественности и типирования новообразований ЩЖ, либо для нормализации результатов количественных оценок при ПЦР-анализе.

*А.В. Ивличев, Н.А. Наволокин, Г.А. Афанасьева, Д.А. Мудрак, С.А. Тычина, М.О. Воронков, Н.В. Корчаков, Н.В. Полуконова, А.Б. Бучарская, Г.Н. Маслякова*

### **АКТИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ**

#### **НА ФОНЕ ПЕРЕВИВАЕМОГО РАКА ПЕЧЕНИ РС-1**

#### **ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ**

#### **ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТА КУКУРУЗЫ АНТАЦИАНОВОЙ**

*ГБОУ ВПО СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ, Саратов*

**Цель исследования.** Изучить влияние флавоноидсодержащего экстракта антоциановой формы кукурузы обыкновенной (*Zea mays* L.) на активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эксперименте *in vivo* на лабораторных крысах с перевитым раком печени.

**Материалы и методы.** Сырье собрано на территории Саратовской обл., экстракт кукурузы получен авторским способом (Патент РФ №2482863). Дизайн эксперимента: животные с перевитым раком печени РС-1 были разделены на 3 группы. Первая – группа сравнения с опухолью без воздействия экстракта. Вторая и третья группы – экспериментальные с однократным пероральным и однократным внутримышечным введением экстракта кукурузы антоциановой через 1 месяц после перевивки опухоли. Животных выводили из эксперимента путем декапитации, анализ содержания гидроперекисей липидов и молекул средней массы (МСМ) проводили в сыворотке крови стандартными спектрофотометрическими методами.

**Результаты и выводы.** При пероральном введении экстракта кукурузы отмечали уменьшение МСМ и гидроперекисей липидов в отличие от группы сравнения, что свидетельствует о подавлении активности ПОЛ и выраженности аутоинтоксикации. При внутримышечном способе введения не происходит достоверное снижение исследуемых показателей. Требуется дальнейшее детальное изучение активности ПОЛ при введении флавоноидов у животных с перевитыми опухолями.

*Е.В. Игнатьева<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, И.В. Ярцева<sup>1</sup>, Р.В. Арустамян<sup>2</sup>, З.С. Шпрах<sup>1</sup>*

**РАЗРАБОТКА ПОКАЗАТЕЛЯ «РАСТВОРЕНИЕ»  
ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА**

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Тест «Растворение» является одним из важных критериев качества твердых пероральных лекарственных форм и необходим для оценки качества готового лекарственного средства, его стабильности.

**Задачей** настоящего исследования явилась разработка теста «Растворение» для отечественного лекарственного средства «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг», предлагаемого для лечения эстрогенозависимых опухолей.

**Материалы и методы.** Образцы лекарственного препарата (ЛП) «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг» (СЕКО-); фармацевтическая субстанция СЕКО- (ЗАО «БиоХимМак СТ», Москва), прибор для определения растворения (аппарат П, «лопастная мешалка») спектрофотометрия.

**Результаты и обсуждение.** Показатель «Растворение» подразумевает количество фармацевтической субстанции (ФС), высвобождающейся в стандартных условиях за определенный промежуток времени в среду растворения из твердой дозированной лекарственной формы. Определение проводили с помощью аппарата для проверки растворимости ERWEKA серии 700 (аппарат П, лопастная мешалка). Количество СЕКО-, перешедшего в среду растворения, определяли спектрофотометрически. На первом этапе исследования в качестве среды растворения использовали воду, 0,1 М и 0,2 М растворы хлористоводородной кислоты, фосфатный буферный раствор (рН 6,8), в разных экспериментах изменяя скорость перемешивания, объем растворителя и время отбора пробы. Однако количество вещества, перешедшего в среду растворения, оказалось недостаточным и не удовлетворяло требованиям ГФ (не менее 75 %). В дальнейшем для увеличения выхода СЕКО- в среду растворения использовали 0,2 % раствор твина-80 в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты. При объеме растворителя 900 мл в течение 2 часов в раствор высвобождалось более 75 % СЕКО-. Следует отметить, что результат теста «Растворение» для исследованного ЛП зависит от влажности гранулята.

**Выводы.** Разработанная методика теста «Растворение» позволяет оценить качество лекарственной формы «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг».

*Авторы выражают благодарность ООО «Медресурс» (г. Москва) за финансовую поддержку исследований*

*Ю.П. Истомирн, Т.П. Артемьева, Н.А. Петровская, А.Н. Мазуренко, Д.А. Церковский*

**НЕПОСРЕДСТВЕННЫЕ И ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ  
БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ ФОТОЛОН**

*РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь*

**Цель исследования.** Оценка эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) с фотолоном у пациентов с базальноклеточным раком кожи (T1–2N0M0).

**Материалы и методы.** Методом ФДТ было пролечено 130 пациентов (156 очагов). Средний возраст – 56,9±9,2 года. Фотолон вводили внутривенно в дозах 2,0 – 2,5 мг/кг. Через 2,5 – 3 ч на аппаратах LD680-2000 («Биоспек», РФ, λ=670 нм) и УПЛ ФДТ («ЛЕМТ», РБ, λ=660±5 нм) проводили сеанс фотооблучения. Параметры: экспозиционная доза – 50 – 200 Дж/см<sup>2</sup>; плотность мощности – 0,1 – 0,52 Вт/см<sup>2</sup>; число полей – 1 – 5 и время облучения – 3 – 20 минут.

**Результаты и выводы.** При контрольном обследовании через 1 – 3 месяца полная регрессия достигнута у 119 (91,5 %) пациентов, частичная – у 8 (6,2 %), стабилизация – у 2 (1,5 %) и продолжение роста – у 1 (0,8 %). Объективный терапевтический эффект достигнут у 97,7 % пациентов, лечебный ответ – 99,2 %. В сроки наблюдения от 6 до 60 месяцев локальный рецидив выявлен в 10,8 % случаев. Побочных реакций и осложнений не отмечено. Полученные результаты позволяют говорить о методе ФДТ как о высокоэффективной опции лечения данной патологии.

*Ю.П. Истомирн, Т.П. Артемьева, Н.А. Петровская, А.Н. Мазуренко, Д.А. Церковский*

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ФОТОЛОНОМ  
В ЛЕЧЕНИИ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ**

*РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь*

**Цель исследования.** Оценка непосредственных результатов фотодинамической терапии (ФДТ) с фотолоном у пациентов с внутрикожными метастазами меланомы кожи.

**Материалы и методы.** Методом ФДТ было пролечено 50 пациентов с внутрикожными метастазами меланомы кожи (>500 очагов). Средний возраст – 60,7±10,4 лет. Фотолон вводился внутривенно в дозах 1,5 – 3,0 мг/кг. Курс лечения включал от 1 до 8 сеансов (суммарно 125 сеансов). Фотооблучение осуществляли через 3 – 4 часа после введения ФС на аппаратах «УПЛ-ФДТ» (ЛЕМТ, λ=660±5 нм) и «ФДТ-лазер» (НАН Б, λ=660 нм) в экспозиционной дозе 300 – 400 Дж/см<sup>2</sup> с плотностью мощности – от 0,2 до 0,9 Вт/см<sup>2</sup>. Число полей – 3 – 17 и время облучения – 5 – 22 минуты. Период наблюдения составил 2 – 23 месяца.

**Результаты и выводы.** При контроле через 1 – 3 месяца полная регрессия отмечена у 10 (20 %) пациентов, частичная – у 28 (56 %), стабилизация – у 7 (14 %), прогрессирование – у 5 (10 %) пациентов. Объективный терапевтический эффект достигнут у 76 % пациентов, лечебный – у 90 %. Побочных реакций и осложнений выявлено не было. Применение ФДТ в паллиативных целях позволяет уменьшать объем опухоли и улучшать качество жизни данной категории пациентов.

*А.А. Калинина, Л.М. Хромых, И.А. Кудрявцев, Д.Б. Казанский*

### **АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИКЛОФИЛИНА А ЧЕЛОВЕКА**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

**Актуальность.** Циклофилин А (ЦФА, 18 кДа), присутствует в крови, тканевых жидкостях и молоке человека, является хемоаттрактантом для стволовых клеток костного мозга и ранних предшественников различных ростков дифференцировки, способствует дифференцировке и созреванию дендритных клеток, осуществляет контроль баланса между Т-хелперами первого и второго типов, подавляя активность Т-хелперов 2.

**Цель работы.** Оценка влияния рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦФА) на экспериментальное метастазирование карциномы легкого Льюис (LLC) мышей.

**Материалы и методы.** Первичную опухоль удаляли на 8-й день после прививки мышам C57BL/6 клеток LLC. Белок вводили в дозе 200 мкг/мышь в течение 7 дней до или после удаления опухолевого узла. Оценка эффективности рчЦФА проводили на 21 день после удаления опухоли. Выраженность метастазирования в легких оценивали макроскопически по 5-бальной системе.

**Результаты.** Введение рчЦФА приводило к значительному снижению степени поражения легкого (с 5 баллов в контроле до 2 в опытной группах). Торможение образования метастазов составило 68% и 37% при введении белка до или после удаления опухолевого узла соответственно.

**Вывод.** Введение мышам рчЦФА до удаления опухолевого узла приводит к более значительному снижению образования метастазов у мышей с LLC по сравнению с послеоперационным введением белка.

*А.А. Калинина, Л.М. Хромых, И.А. Кудрявцев, Д.Б. Казанский*

### **ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИКЛОФИЛИНА А ЧЕЛОВЕКА НА РЕЦИДИВ ОПУХОЛИ**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

**Актуальность.** Циклофилина А (ЦФА) – белок, 18 кДа, обладает изомеразной активностью. Существует во внутриклеточной и секреторной формах. Продуцируется различными типами клеток при инфицировании организма и окислительных стрессах, является провоспалительным фактором, привлекающим клетки иммунной системы в очаг воспаления. Участвует в патогенезе сепсиса, диабета, вирусных, аутоиммунных, аллергических, кардиологических и онкологических заболеваний.

**Цель работы.** Оценка влияния рекомбинантного ЦФА человека (рчЦФА) на возникновение послеоперационных рецидивов карциномы легкого Льюиса (LLC) у мышей C57BL/6.

**Материалы и методы.** Первичную опухоль удаляли на 8-й день после прививки. Оценка эффективности рчЦФА проводили на 21 день после удаления узла. Белок вводили в дозе 200 мкг/мышь в течение 7 дней до или после операции. При оценке результатов определяли: 1) частоту рецидивов; 2) среднюю продолжительность безрецидивного периода.

**Результаты.** Введение рчЦФА приводило к значительному снижению частоты рецидивов LLC (с 90 % в контроле до 20 % и 50 % при введении белка в течение 7 дней до или после удаления опухолевого узла соответственно). Продолжительность безрецидивного периода составила 9 дней в контроле и 18 и 14 дней в указанных опытных группах животных.

**Выводы.** Введение мышам рчЦФА до удаления опухолевого узла приводит к значительному снижению частоты рецидивов опухоли и увеличению безрецидивного периода.

*С.А. Каложный, Е.А. Дудко, С.Д. Коломийцев, Н.О. Вихлянцева, Р.Ю. Раманускайте, А.С. Тюляндина, Т.А. Богуш*

### **КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА RRM1 МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** RRM1 – это одна из двух субъединиц рибонуклеотидредуктазы, катализирующей превращение рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды. В экспериментальных исследованиях показано, что высокая экспрессия RRM1 ассоциирована с резистентностью к гемцитабину, который применяется при терапии рака яичников, однако клинические данные об экспрессии RRM1 единичны и получены при использовании полуколичественных методов иммуногистохимии и полимеразной цепной реакции. В настоящем исследовании проведена строго количественная оценка частоты, уровня и интенсивности экспрессии RRM1 в ткани рака яичников иммунофлуоресцентным методом, разработанным авторами, с использованием проточной цитофлуориметрии.

**Материалы и методы.** Проанализировано 44 хирургических образца серозной аденокарциномы яичников (первичные и рецидивные опухоли тех же пациентов). Одноклеточные суспензии инкубировали с первичными (ab81085) антителами в течение ночи и затем 1,5 часа с вторичными (DyLight650, ab98510) антителами. Показатели экспрессии RRM1 анализировали с помощью программы FlowJo статистическим методом Колмогорова-Смирнова. Интенсивность экспрессии RRM1 – отношение специфической флуоресценции к контрольному показателю (только вторичные антитела): высокая – отношение  $\geq 2,5$ , низкая –  $< 2,5$  усл. ед. Уровень экспрессии RRM1 – количество специфически флуоресцирующих клеток относительно общего количества: высокий – количество специфически окрашенных клеток в опухоли  $\geq 40\%$ , низкий –  $< 40\%$ .

**Результаты.** 1. Экспрессия RRM1 выявлена в 100% первичных опухолей со значительными отличиями в уровне экспрессии маркера у разных пациентов (средний показатель  $47,2 \pm 16,4\%$ , минимум – 28 %, максимум – 73 %). 2. Высокий уровень RRM1 выявлен в 67 % (средний показатель  $57,4 \pm 10,5\%$ ), низкий – в 23 % случаев (средний показатель  $29,9 \pm 7,4\%$ ). 3. Средняя интенсивность экспрессии RRM1 в группе с высоким уровнем маркера составила  $4,4 \pm 2,4$  усл. ед., в группе с низкой экспрессией –  $1,9 \pm 0,3$  усл. ед. 4. Показатели экспрессии RRM1 были одинаковы в первичных и рецидивных опухолях, независимо от молекулярного фенотипа первичной опухоли.

**Заключение.** Полученные данные о низкой экспрессии RRM1 приблизительно в 25 % исследованных опухолей согласуются с клиническими наблюдениями об эффективности гемцитабина у 25 – 30 % больных раком яичников, что свидетельствует о возможной клинической предиктивной значимости показателей экспрессии RRM1 в отношении гемцитабина.

*Поддержано грантами РФФИ (13-04-01004-а, 15-04-06991-а, 14-04-31734-мол-а) и программой РАН (ФИМТ-2014-205).*



*П.М. Канаев, О.Н. Дерябина, Н.А. Плотникова*

### **ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ, ИНДУЦИРОВАННЫХ БЕНЗ(А)ПИРЕНОМ ОПУХОЛЕЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ У МЫШЕЙ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕКСИДОЛА И МЕЛАТОНИНА**

*ФГБОУ ВПО «МорГУ им. Н.П. Огарева», Медицинский институт, Саранск*

**Цель исследования.** Изучение воздействия мелатонина и мексидола на динамику патоморфологических изменений в тканях мезенхимального гистогенеза.

**Задачи исследования.** Изучение воздействия мелатонина и мексидола на динамику патоморфологических изменений в мягких тканях.

**Материалы и методы.** Эксперимент был проведен на 120 мышах. Мыши были разделены на 4 группы: 3 опытные группы по 30 животных, 30 животных составили контрольную группу. Животным всех четырех групп однократно вводился канцероген – БП. Животные 1-й группы получали мелатонин в дозе 2 мг/л. Животные 2-й группы – мексидол в дозе 0,1 мг/кг. Животные 3-й группы – мексидол в дозе 0,1 мг/кг и мелатонин в дозе 2 мг/л. Животные 4-й группы составили контрольную группу.

**Результаты.** Микроскопически опухоль на фоне совместного применения мелатонина и мексидола характеризовалось выраженным полиморфным клеточным составом: наличием веретенновидных клеток, фибробластоподобных и гистиоподобных элементов, нередко с формированием характерных «муаровых» структур. В отдельных случаях встречались ксантомные клетки, гигантские многоядерные клетки типа Тутона и типа остеокластов. Таким образом, на фоне применения мелатонина и мексидола в опухолевых узлах, индуцированных бенз(а)пиреном у мышей формировались типичные (фиброзные) формы злокачественной гистиоцитомы, представленные фибробластоподобными клеточными формами. Характерными были также признаки клеточного атипизма и полиморфизма. Однако, в строме опухолевой ткани не были выявлены очаги ослизнения и миксоматоза, участки некроза и кровоизлияний встречались в единичных случаях. Данные морфологические признаки являются проявлением вторичных изменений в опухолевой ткани. Уменьшение или отсутствие подобных вторичных изменений свидетельствует, на наш взгляд, о снижении элементов опухолевой прогрессии.

**Выводы.** Совместное использование изучаемых препаратов в условиях экспериментального опухолевого роста мягких тканей сопровождается положительной патоморфологической динамикой, что проявляется уменьшением числа случаев плоскоклеточного рака кожи до 20 %, (в контроле – 50 %), а также снижением митотического индекса на 48 % и 40 % соответственно.

*О.Л. Канделинская<sup>1</sup>, Е.Р. Грищенко<sup>1</sup>, Л.Н. Николаевич<sup>2</sup>, Н.А. Шуканова<sup>3</sup>, М.М. Молчан<sup>3</sup>, Е.А. Девина<sup>4</sup>, А.Д. Таганович<sup>4</sup>, Е.П. Вашкевич<sup>5</sup>, Н. Савицкене<sup>6</sup>, А. Савицкас<sup>6</sup>*

### **ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ СУБСТАНЦИЙ ЛЕКТИНОВ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ФЛОРЫ БЕЛАРУСИ**

<sup>1</sup>Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>4</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

<sup>5</sup>РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

<sup>6</sup>Литовский университет наук о здоровье, Каунас, Литва

**Цель и задачи исследований.** Получение и исследование субстанций фитолектинов (СФЛ).

**Материалы и методы.** Из цетрарии исландской, эхинацеи пурпурной и чистотела большого получены СФЛ: *Cetraria Islandica agglutinin* – СІА; *Echinacea purpurea agglutinin* – ЕРА; *Chelidonium majus agglutinin* – СМА. Иммуностимулирующее действие (ИД) СФЛ оценивали по их влиянию на функциональную активность легочных макрофагов крыс, ЕК- и Т-клеток человека. Цитостатическое действие (ЦД) определяли по влиянию СФЛ на пролиферацию клеток глиомы крыс линии С6; по активности фермента ацетилхолинэстеразы в клетках рака молочной железы человека (РМЖ).

**Результаты.** По ИД в отношении легочных макрофагов крыс исследуемые СФЛ располагались так: ЕРА>СІА>СМА; по ЦД на трансформированные клетки - СМА>СІА>ЕРА. Показано, что ИД и ЦД полученных СФЛ сохранялось в составе капсул: наибольшим ИД в отношении ЕК- и Т-клеток человека обладали ЕРА- и СІА-капсулы, а по ЦД в отношении клеток РМЖ – СМА- и СІА-капсулы. Выявлены дозозависимые эффекты ЦД СМА-капсул на рост клеток рака легких линии А549 *in vitro*. В экспериментах *in vivo* на мышах получены предварительные данные о противоопухолевом действии СМА-капсул в отношении саркомы Lewis, которое выражалось в уменьшении площади метастазов в легких и интенсивности в них опухолевого процесса.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о фармакологической значимости лектинов эхинацеи пурпурной, цетрарии исландской и чистотела большого и необходимости исследований молекулярных механизмов их иммуностимулирующей и цитостатического действия.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ № Б13ЛИТ-008.*

*В.Н. Капинус, М.А. Каплан, Е.В. Ярославцева-Исаева, И.С. Стиченко*

### ОСОБЕННОСТИ ФДТ БАЗАЛЬНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ ВОЛОСИСТОЙ ЧАСТИ ГОЛОВЫ

*Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф.Цыба – филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. П.А.Герцена, Обнинск*

**Актуальность.** Кожа волосистой части головы имеет ряд особенностей: большое количество волосяных фолликулов, сальных желез; слабо развита подкожная жировая клетчатка; мышцы свода черепа имеют обширную сухожильную часть, рыхло связанную с надкостницей и тесно срастающуюся с кожей; лимфоотток осуществляется по лимфатическим сосудам в затылочные, сосцевидные, околоушные, лицевые, поднижнечелюстные, подбородочные лимфатические узлы (при неопластических процессах на волосистой части головы возможно увеличение лимфатических узлов в перечисленных областях). Указанные особенности необходимо учитывать при лечении новообразований данной локализации.

**Цель исследования.** Оценка эффективности и анализ клинических особенностей ФДТ у больных базально-клеточным раком кожи (БКРК) волосистой части головы.

**Материалы и методы.** ФДТ была проведена 89 больным БКРК, локализованным в области волосистой части головы. Для проведения ФДТ использовался фотосенсибилизатор хлоринового ряда в дозе 1,1 – 1,6 мг/кг веса тела, световая энергия составила 100 – 300 Дж/см<sup>2</sup>.

**Результаты.** После ФДТ полная регрессия опухолевых очагов была у 73 из 89 больных (82,0 %), частичная регрессия – у 13 (14,6 %) пациентов, стабилизация – у 3 (3,4 %) человек. Отмечены следующие особенности ФДТ данной локализации: более выраженный болевой синдром во время ФДТ, продолжительные болевой и отечный синдром после ФДТ, частое развитие фолликулитов, что требует назначения антибактериальных средств, более продолжительный период отторжения некротических тканей и, соответственно, эпителизации, обнажение подлежащих костных структур (особенно после лечения рецидивов заболевания), очаговая алопеция в зоне рубца, регионарные лимфадениты.

*О.В. Кеца, И.А. Шмараков, О.А. Петрик*

### АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИЕ $\omega$ -3 ПНЖК

*Черновицкий национальный университет, Черновцы, Украина*

**Актуальность.** Перспектива применения противоопухолевых препаратов существенно зависит от исследования клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе развития рака. Ранняя коррекция этих механизмов полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), могла бы гипотетически предотвратить развитие и прогресс онкозаболеваний.

**Цель работы.** Изучение влияния  $\omega$ -3 ПНЖК на активность супероксиддисмутазы (СОД) в митохондриальной фракции карциномы Герена.

**Результаты.** Показано, что период интенсивного роста опухоли сопровождается повышением активности митохондриальной СОД карциномы Герена, что может лежать в основе резистентности к противоопухолевым препаратам. Предварительное введение  $\omega$ -3 ПНЖК приводит к снижению активности СОД митохондрий опухоли в логарифмическую фазу онкогенеза и как следствие к накоплению активных форм кислорода (АФК). Повышая генерацию АФК в опухолевых клетках,  $\omega$ -3 ПНЖК, тем самым, усиливают апоптоз через экспрессию p53, p21 и Вах, с одновременным торможением экспрессии антиапоптотического протеина Bcl-2. Установленные изменения могут способствовать снижению мембранного потенциала митохондрий со следующим высвобождением цитохрома c в цитозоль, запуская апоптоз через каспаза-3- и каспаза-9-зависимый путь. Кроме того, ПНЖК через экспрессию p53 и p21 могут привести к блокированию клеточного цикла трансформированных клеток.

**Выводы.** Таким образом, торможение опухолевого роста с участием  $\omega$ -3 ПНЖК может реализоваться через прооксидантно-антиоксидантную систему, что лежит в основе поиска нетоксических альтернативных способов терапии рака.

*М.Д. Киселева, З.С. Шпрах, Л.Г. Деженкова, Л.М. Борисова, Т.Д. Миникер, Л.В. Эктова, А.А. Штиль, З.С. Смирнова*

### ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ ЛХС-1208 НА ТОПОИЗОМЕРАЗУ I

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

**Актуальность.** Производные индолокарбазолов обладают разным биологическим действием, в том числе и противоопухолевым. Важным свойством является индукция гибели опухолевых клеток в результате взаимодействия с несколькими внутриклеточными мишенями. Указанные соединения ингибируют циклинзависимые киназы, протеинкиназу С и тирозинкиназы, а также топоизомеразу I.

**Цель исследования.** Изучить действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208 на активность топоизомеразы I.

**Материалы и методы.** Плазмиду pBR322 (суперскрученная форма ДНК) инкубировали с топоизомеразой I (1 ЕД) в присутствии ЛХС-1208 (0,5 – 40 мкМ) при температуре 30 °С, 30 мин в буфере, содержащем 35 мМ Трис-НСI (рН 8,0), 72 мМ КСI, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дигиотрейтола, 2 мМ спермидина и 0,1 мг/мл бычьего сыровоточного альбумина. Реакцию останавливали внесением додецилсульфата натрия. В реакционную смесь добавляли протеиназу К и инкубировали 30 мин. Проводили электрофорез ДНК в 1% агарозном геле (состав буфера: 40 мМ Трис-основания, 1 мМ ЭДТА, 30 мМ ледяной уксусной кислоты) и окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл).

**Результаты.** Топоизомераза I вызывает раскручивание плазмидной ДНК, вместо суперскрученной формы появляются открытая (ОК) и закрытая (ЗК) кольцевые формы, мигрирующие в геле медленно. В присутствии относительно низких (до 1 мкМ) концентраций ЛХС-1208 видны топоизомеры ДНК, мигрирующие быстрее. В присутствии 2,5 мкМ ЛХС-1208 образуются частично релаксированные формы ДНК, что свидетельствует о частичном снижении активности фермента. При концентрациях ЛХС-1208  $\geq$  5 мкМ релаксация плазмиды отсутствует, что означает полное ингибирование топоизомеразы I.

**Заключение.** Установлено, что производное индолокарбазолов ЛХС-1208 в концентрациях  $\geq$  5 мкМ ингибирует фермент топоизомеразу I. Это свойство позволяет считать соединение перспективным кандидатом для разработки противоопухолевых препаратов класса индолокарбазолов.

*М.П. Киселева, Л.М. Борисова, З.С. Шпрах, А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова, Т.Д. Миникер, Л.В. Эктова, З.С. Смирнова*

### **АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ ЛХС-1208**

*ФГБНУ «РОИЦ им.Н.Н.Блохина», Москва*

**Актуальность.** Метастазирование опухоли – один из основных признаков ее злокачественности. Поэтому раннее метастазирование снижает эффективность всех известных методов терапии, применяемых при лечении больных со злокачественными опухолями. Это послужило основанием изучения антиметастатического действия ЛХС-1208.

**Цель исследования.** Изучение антиметастатического действия ЛХС-1208 на эпидермоидной карциноме легкого Lewis (LLC).

**Материалы и методы.** В опытах с перевиваемой подкожно опухолью LLC использованы иммунокомпетентные мыши-гибриды первого поколения BDF<sub>1</sub> (C<sub>57</sub>Bl/6j × DBA/2), самцы, массой тела 18 – 22 г, а для поддержания штамма мыши-самцы линии C57Bl/6j при внутримышечной перевивке. Удаление опухолевого узла проводили на 9 день после перевивки опухоли, а на 10 день вводили ЛХС-1208 однократно внутривенно в терапевтической дозе 150 мг/кг и в дозе 125 мг/кг. Критериями оценки антиметастатического действия служили торможение роста спонтанных метастазов при подкожной перевивке в присутствии первичного опухолевого узла и на фоне удаленной опухоли (ТРМ, %) и увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных (УПЖ, %).

**Результаты.** Проведенные исследования показали, что при сохраненном опухолевом узле препарат в дозе 125 мг/кг вызывает ТРМ равное 33 %, а в терапевтической дозе 150 мг/кг ТРМ=30 %. При удалении первичного опухолевого узла ЛХС-1208 в дозе 125 мг/кг оказывает ТРМ равное 28 %, а в терапевтической дозе 150 мг/кг ТРМ составляет 32 %. Равное торможение роста спонтанных метастазов установлено в контрольной группе с хирургическим удалением первичного опухолевого узла: ТРМ = 30 %. Кроме того, наблюдали незначительное увеличение продолжительности жизни мышей: УПЖ в опытных группах 5–13 %.

**Заключение.** Результаты исследования производного индокарбазолов ЛХС-1208 позволяют констатировать наличие слабой дозозависимой, но статистически значимой антиметастатической активности. Кроме того, полученные данные дают основание продолжить исследования по оценке антиметастатической активности ЛХС-1208 в комбинации с другими противоопухолевыми средствами.

*М.В. Киселевский<sup>1</sup>, Н.Ю. Анисимова<sup>1</sup>, Т.Х. Тенчурин<sup>2</sup>, В.Г. Мамагулашвили<sup>2</sup>, С.М. Ситдикова<sup>1</sup>,*

### **БИОСОВМЕСТИМОСТЬ МАТРИКСОВ ТРАХЕИ**

#### **НА ОСНОВЕ НЕТКАНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

*<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

*<sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва*

**Актуальность** разработки инновационных способов получения биоимплантатов трахеи и/или главных бронхов обусловлена тем, что замещение дефектов данной локализации является одной из наиболее сложных и до конца нерешенных проблем медицины.

**Цель исследования.** Разработка методологических подходов создания матрикса трахеи нового поколения, на основе биосовместимого полимерного ультраволокнистого материала, обеспечивающего адгезию клеток реципиента.

**Материалы и методы.** На основе технологии получения нетканых материалов, разработанной в НИЦ «Курчатовский институт», были созданы экспериментальные образцы матрикса трахеи из пористого ультраволокнистого материала, армированного кольцами из полиуретана. Исследование биосовместимости образцов осуществляли *in vitro* (адгезия мезенхимальных стромальных клеток (МСК), цитотоксичность и индукция гемолиза) и *in vivo* – через 3 месяца после подкожной имплантации образцов матрикса мышам линии C57Bl/6 (n=16) оценивали структуру образцов и прилегающих тканей. Общетоксическое действие матрикса оценивали по результатам гистологического исследования внутренних органов.

**Результаты.** Установлены отсутствие статистически достоверного токсического воздействия тестируемых образцов на клетки человека и животных *in vitro*, а также адгезия МСК к волокнам ультраволокнистого материала. У животных с имплантированными образцами матрикса трахеи в течение всего времени наблюдения не отмечалось местных и системных признаков развития реакции отторжения образцов. Матрикс трахеи интенсивно колонизировались клетками реципиента и были интегрированы в окружающие ткани.

**Заключение.** Проведенные испытания свидетельствуют о биосовместимости образцов матрикса трахеи. Можно предполагать, что нетканый материал, формирующий стенки матрикса будет выполнять роль депо для МСК реципиента, а армирование матрикса полиуретановыми кольцами повысит функциональность биоимплантата и даст возможность избежать применения стентов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение № 14.604.21.0023 от 17.06.2014 г. о предоставлении субсидии, RFMEFI57614X0063).*

*О.В. Клименко<sup>1</sup>, С.А. Сасов<sup>2</sup>, В.В. Решетникова<sup>2</sup>, Н.Н. Тотоева<sup>2</sup>, В.Н. Толкачев<sup>2</sup>*

### ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОЧИЩЕННОЙ ФРАКЦИИ ГИДРОЛИЗУЕМЫХ ТАННИНОВ *CHAMAENERION ANGUSTIFOLIUM* (L.) И *OENOTHEIN B* НА ГЕНЕТИКУ И МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК KASUMI-1

<sup>1</sup>РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

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

**Актуальность.** Исследования последних лет показали, что макроциклические гидролизуемые эллаготаннины обладают высокой противоопухолевой активностью, представляющей интерес для практического использования в медицинской практике. Несмотря на интенсивное развитие знаний о растениях, остаются неизвестными свойства их отдельных компонентов.

**Цель и задачи исследования.** Изучение влияния фракций гидролизуемых таннинов растения *Chamaenerion angustifolium* (L.), а также индивидуального Oenothlein B на экспрессию прокаспазных генов; оценить морфологические изменения в клеточной линии Kasumi-1 острого миелоидного лейкоза, а также определить экспрессию гена и протеина иммунорегуляторного фактора FOXP3 в этих клетках в первые 24, 48 и 72 часа после добавления очищенных фракций таннинов в среду.

**Материалы и методы.** Для оценки влияния изучаемых таннинов на клетки острого миелоидного лейкоза нами были использованы методы ОТ-ПЦР, исследование экспрессии протеинов методом вестерн блоттинга, окрашивание образцов при помощи модифицированного метода Лейшмана-Романовского.

**Результаты.** В серии экспериментов *in vitro* мы получили повышение экспрессии генов Каспазы 8, Каспазы 9 и BCL2 после введения фракций таннинов *Chamaenerion angustifolium* (L.) в 2 – 3,6 раза по сравнению с контролем. Нами было получено изменение морфологических характеристик изучаемой клеточной линии после добавления в среду гидролизуемых таннинов и Oenothlein B. Было выявлено увеличение экспрессии гена и протеина FOXP3 уже через первые 24 часа после добавления в среду фракции макроциклических гидролизуемых таннинов и Oenothlein B в 2, а через 72 часа в 4,5 раза (экспрессия гена) и в 3 раза на третьи сутки (для протеина) по сравнению с контролем.

**Выводы.** Гидролизуемые таннины *Chamaenerion angustifolium* (L.) и Oenothlein B стимулируют апоптоз в клетках острого миелоидного лейкоза и изменяют экспрессию фактора иммунорегуляции FOXP3 в клетках клеточной линии Kasumi-1.

*А.С. Козлов, А.А. Красновский*

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ АКТИВАЦИИ КИСЛОРОДНЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ ИХ ПРЯМОМ ВОЗБУЖДЕНИИ ИК ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

**Актуальность.** Переходу кислородных молекул из основного в синглетные состояния соответствуют полосы поглощения в ближней ИК-области (765, 1070 и 1273 нм). Лазерное возбуждение этих переходов приводит к образованию реакционно-способного синглетного кислорода. Предполагают, что этот процесс может использоваться в ИК лазерной терапии рака. Для обоснования этого представления необходима информация об оптической плотности ИК полос поглощения молекул кислорода, которая определяет эффективность генерации синглетного кислорода лазерным излучением. Поскольку оптическая плотность мала и ее невозможно измерить прямыми спектрофотометрическими методами, в нашей лаборатории разработан фотохимический метод анализа, в основе которого лежит прямое возбуждение кислорода ИК диодными лазерами с последующей регистрацией образовавшегося синглетного кислорода с помощью химических ловушек синглетного кислорода. Недавно нам удалось увеличить точность анализа за счет применения нового способа математической обработки данных.

**Цель работы** состояла в том, чтобы применить новую методику к исследованию абсорбционных свойств молекулярного кислорода в модельных и биологических системах.

**Результаты и выводы.** Показано, что в тестовых неполярных органических средах с большим временем жизни синглетного кислорода, синглетный кислород заселяется при лазерном возбуждении всех указанных полос, причем соотношение максимумов полос составляет 0,13:0,05:1 соответственно. Оптическая плотность в этих максимумах линейно зависит от растворимости кислорода и молярного коэффициента поглощения. Получены значения молярных коэффициентов поглощения. Показано, что с увеличением полярности среды молярный коэффициент в полосе 1273 нм уменьшается (от ~5,3 до  $1,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), достигая минимума в водных системах, тогда как интенсивность полосы 765 нм в тех же условиях возрастала, достигая максимума (примерно в 1,7 раза больше) в воде. В результате, в водных системах эффективность заселения синглетного кислорода лазерами с длиной волны 1273 и 765 нм почти одинакова. Таким образом, генерация синглетного кислорода за счет прямого возбуждения кислородных молекул реально происходит в естественных системах, причем лазеры с длиной волны 1273 и 765 нм наиболее эффективны, а полоса 1070 нм мало пригодна, по крайней мере, для биологических экспериментов. Обсуждаются перспективы применения изученных эффектов.

*А.В. Колаева, Т.С. Быркина, Н.Д. Олтаржевская*

### СНИЖЕНИЕ ИСХОДНОЙ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ

*ООО «КОЛЕТЕКС», Москва*

**Актуальность.** Научные разработки, проводимые в ООО «Колетекс», позволили создать медицинские изделия «Колегель», обладающие уникальными свойствами: пролонгированное действие и целенаправленная доставка лекарственного вещества к очагу поражения, и представляющие собой вязкие композиции на основе альгината натрия, с введенными в них различными лекарственными веществами. В соответствии с ГОСТ Р ИСО 11137-2000 материалы медицинского назначения, вводимые в полости организма и контактирующие с поврежденными тканями, должны быть стерильными.

**Цель исследования.** Изучение влияния радиационной стерилизации на микробиологические и реологические характеристики альгината натрия при производстве медицинских изделий «Колегель».

**Задачи исследования.** Основной проблемой, возникающей при производстве продукции марки «Колегель», является высокая обсеменяемость альгината натрия и, как следствие, изготавливаемых из него изделий. Поэтому основной задачей является разработка способов уменьшения микробной обсемененности данной продукции, и в обязательном порядке стерилизации.

**Материалы и методы.** В данной работе исследовали изменение вязкости альгината натрия методом вискозиметрии и микробную обсемененность – чашечным агаровым методом.

**Результаты.** Производство материала «Колегель» предусматривает финишную радиационную стерилизацию в дозе 6 кГр. Увеличение стерилизационной дозы не желательно, т.к. оно может привести к снижению вязкости гидрогеля и, как следствие, потери необходимых терапевтических свойств. Для снижения вторичной (т.е. возникающей в процессе транспортировки и хранения) микробной контаминации альгината натрия была исследована возможность его радиационного облучения (гамма-обработка, электронно-лучевая обработка). Результаты показали, что предварительная гамма-обработка альгината натрия в большей степени снижает общую микробную обсемененность альгината натрия, по сравнению с электронно-лучевой. Однако, при предварительном радиационном облучении альгината натрия дозой 6 кГр резко снижается вязкость гидрогелевой композиции, приготовленной на его основе. При финишной же стерилизации радиационным облучением дозой 6 кГр данной альгинатной гидрогелевой композиции её вязкость снижается на 99,2 % в случае электронно-лучевой обработки и на 94,8 % в случае гамма-обработки.

**Вывод.** Способ снижения микробной контаминации альгината натрия посредством его обработки радиационным облучением является неэффективным.

*Е.Ю. Колдаева, А.В. Смирнова, А.А. Липенгольц, Е.Ю. Григорьева*

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ НАРКОТИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТОМОГРАФИИ

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Цель исследования.** Выбор оптимального способа наркотизации мелких лабораторных животных для проведения томографии в течение необходимого для исследования времени.

**Материалы и методы.** В работе использовали мышей BDF<sub>1</sub> и крыс Wistar. Испытывали принятые в ветеринарии препараты: Ксилазин (Ксила), 20 мг/мл, фирма Interchemie, Holland и Золетил 100, фирма Virbac, France. Мыши: путь введения – ретроорбитальный, внутрибрюшинный; дозы Ксилы – 5,0, 7,5 и 10,0 мг/кг массы тела; дозы Золетила 100 – 10 мг/кг массы тела. Крысы: путь введения – внутримышечный; дозы Ксилы – 8,0, 10,0 мг/кг массы тела; дозы Золетила 100 – 10 и 20 мг/кг массы тела. Регистрировали наличие/отсутствие фазы возбуждения, явления заторможенности, дискоординии движений, атаксии, миорелаксации, продолжительность глубокого сна. Отмечали побочные токсические эффекты.

**Результаты.** Введение Золетила крысам (внутримышечное) и мышам (внутрибрюшинное) в дозе 10 мг/кг обеспечивало хорошую миорелаксацию, сон через 2 – 5 минут после введения продолжительностью 30 – 40 минут. Фаза возбуждения отсутствует. Выход из наркоза быстрый и ровный. Введение Ксилы в дозе 7,5 мг/кг мышам (внутрибрюшинно) и 8,0 мг/кг крысам (внутримышечно) позволяло в течение 5 – 7 минут достичь глубокого сна продолжительностью 1,5 – 2 часа. При введении Ксилы крысам фаза возбуждения отсутствовала, при наличии ее у мышей. Выход из наркоза постепенный.

**Заключение.** Для проведения томографии мелких лабораторных животных можно рекомендовать применение Ксилы (7,5 мг/кг внутрибрюшинно мышам, 8,0 мг/кг внутримышечно крысам) и Золетила 100 (10 мг/кг внутрибрюшинно мышам; 10 мг/кг внутримышечно крысам).

*Н.Н. Колесников<sup>1</sup>, С.Е. Титов<sup>1,2</sup>, Е.С. Малахина<sup>3</sup>, Т.Л. Полоз<sup>4</sup>, С.П. Шевченко<sup>5</sup>, М.К. Иванов<sup>2</sup>, И.Ф. Жимулев<sup>1</sup>*  
**МИКРОРНК ПРОФИЛИРОВАНИЕ И МУТАЦИЯ BRAF**

**В ДИАГНОСТИКЕ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

<sup>1</sup>ФГБУН ИМКБ СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>ЗАО "Вектор-Бест", Кольцово

<sup>3</sup>ФГБУН ИХБФМ, ЦНМТ СО РАН, Новосибирск

<sup>4</sup>НУЗ ДКБ на ст. Новосибирск-Главный ОАО «РЖД», Новосибирск

<sup>5</sup>МБУЗ ГКБ №1, Новосибирск

Создание высокоэффективных количественных надежных методов ранней диагностики злокачественных новообразований является насущной потребностью клинической онкологии. На основе профилирования экспрессии 25 микроРНК и анализа соматической мутации *BRAF* разработаны подходы молекулярного типирования новообразований щитовидной железы, позволяющие отличать доброкачественные и злокачественные поражения, и дифференцировать разные типы новообразований щитовидной железы с высокой точностью. В работе использован операционный материал от 208 пациентов и 230 цитологических препаратов тонкоигльной аспирационной биопсии от 120 пациентов. Анализ проводили с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, для нормировки использовали малую РНК U6. Мутацию *BRAF* V600E выявляли с помощью аллель-специфичной ПЦР-РВ. Наличие мутации гена *BRAF*, как диагностического и прогностического маркера, у пациентов с папиллярным раком ЩЖ, свидетельствует о более злокачественном течении заболевания. Распространенность мутации в Новосибирской популяции больных папиллярным раком ЩЖ составила 61,7 %. Профилирование экспрессии микроРНК в наиболее часто встречающихся опухолях щитовидной железы и анализ уровней экспрессии онкогенных и супрессорных микроРНК позволили выявить уникальные молекулярные профили для каждого патоморфологического типа новообразований и разработать статистически достоверные диагностические алгоритмы. Таким образом, показана возможность использования микроРНК в качестве молекулярных маркеров дифференциальной диагностики новообразований щитовидной желез.

*О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, И.Б., Меркулова, Т.В. Абрамова, А.В. Смирнова, Е.Ю. Колдаева, А.А. Сергеев, К.А. Сережин, В.М. Бухман*

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ****ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА****ДЛЯ ПОЗИТРОННОЙ ЭМИССИОННОЙ ТОМОГРАФИИ <sup>18</sup>F- ФДГ (2-<sup>18</sup>F—2-ДЕЗОКСИ-D-ГЛЮКОЗА)**

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Цель исследования.** Доклиническое изучение общетоксического действия диагностического препарата <sup>18</sup>F-ФДГ на лабораторных животных.

**Материалы и методы.** В работе использованы животные обоего пола: 82 мыши линии BDF<sub>1</sub>, 188 неинбредных крыс, 8 собак породы «английский бигль», 6 кроликов породы «Шиншилла» и 60 морских свинок. Дозы животных рассчитывали с учетом весовых коэффициентов, исходя из принятых доз введения человеку – 400 МБк/человека – диагностическая доза (ДД). В опытах по «острой» токсичности максимальные вводимые дозы превышали ДД в 32 раза; в опытах по «субхронической» токсичности (3-кратно, ежедневно, внутривенно) на крысах суммарные дозы соответствовали ДД, 32 ДД и 64 ДД и на собаках – ДД и 32 ДД.

**Результаты.** <sup>18</sup>F- ФДГ при однократном внутривенном введении мышам и крысам самцам и самкам не вызывал гибели животных. Внешние проявления интоксикации и половые различия отсутствовали. Установлена хорошая переносимость животными <sup>18</sup>F- ФДГ при многократном применении в дозах, превышающих ДД в 32 и 64 раза. Многократное применение <sup>18</sup>F- ФДГ вызывало небольшие не дозозависимые изменения в периферической крови животных: увеличение или уменьшение (в 1,5 – 2 раза) количества тромбоцитов, увеличение СОЭ, снижение относительного количества лимфоцитов. У собак <sup>18</sup>F- ФДГ вызывал недозозависимые неспецифические проявления кардиотоксичности, не подтвержденные морфологически. В почках крыс морфологически отмечены необратимые несильно выраженные очаговые деструктивные воспалительные и дистрофические изменения. У собак влияния на функциональное и морфологическое состояние почек не обнаружено. У крыс функциональных и морфологических изменений в печени и поджелудочной железе на все сроки наблюдения не выявлено. Морфологически у всех собак в печени на 30 сутки опыта отмечены умеренные дистрофические изменения. Соединение <sup>18</sup>F- ФДГ не обладает местнораздражающим действием как на 3, так и на 15 сутки после однократного внутривенного введения кроликам. Соединение <sup>18</sup>F- ФДГ обладает выраженными алергизирующими свойствами. Установлено предельное содержание бактериальных эндотоксинов для соединения <sup>18</sup>F- ФДГ – не более 17,5 ЕЭ/мл, которое было рекомендовано для внесения в проект ФСП.

**Заключение.** Полученные результаты по доклиническому изучению токсичности соединения <sup>18</sup>F- ФДГ позволяют рекомендовать его для клинического применения.

*О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, А.А. Сергеев, К.А. Серезжин, В.М. Бухман*

### **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО МЕТОТРЕКСАТА И МЕТОТРЕКСАТА ФИРМЫ ЕБЕВЕ**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Цель исследования.** Сравнительное изучение «острой» и «субхронической» токсичности нового воспроизведенного в лаборатории лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» противоопухолевого препарата метотрексат (МТХ-В) и метотрексата-Ебеве (МТХ-Ебеве) Ебеве Фарма, Австрия.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на 80 мышах-самцах гибридах  $B_6D_2F_1$  и 250 неинбредных крысах-самцах, полученных из разведения ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». МТХ-В приготовлен в лаборатории лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» - концентрат для приготовления раствора для инфузий с концентрацией МТХ 100 мг в мл, во флаконах по 5 мл, серии 030213. МТХ-Ебеве – концентрат для приготовления раствора для инфузий концентрацией МТХ 100 мг в мл, в ампулах по 5 мл, серии DJ5228. Для удобства использования препараты разводили водой для инъекций до концентрации 10 мг в мл. В опытах по «острой» токсичности препараты вводили мышам однократно внутривенно в дозах от 40 до 300 мг/кг, крысам от 5 до 80 мг/кг. В опытах по «субхронической» токсичности препараты вводили внутривенно ежедневно 3-кратно в двух суммарных дозах 1,0 и 0,6 мг/кг.

**Результаты исследования.** При анализе данных, полученных при сравнительном изучении «острой» токсичности на мышах и крысах установлены расчетные токсические дозы МТХ-В для мышей:  $LD_{10}=242$  мг/кг;  $LD_{50}=298$  (256÷346) мг/кг; для крыс:  $LD_{10}=20,0$  мг/кг;  $LD_{50}=42,0$  (34,0÷50,0) мг/кг и МТХ-Ебеве для мышей  $LD_{10}=245$  мг/кг;  $LD_{50}=322$  (248 ÷ 420) мг/кг; для крыс:  $LD_{10}=25,0$  мг/кг;  $LD_{50}=41,0$  (34,0÷48,0) мг/кг, которые практически не отличаются друг от друга. По результатам изучения «субхронической» токсичности установлено, что МТХ и МТХ-Ебеве по показателям токсичности (клинические проявления токсичности, летальность, гематотоксичность, биомаркеры токсичности, морфометрия органов) и по результатам патоморфологического изучения практически не отличаются друг от друга.

**Выводы.** На основании результатов, полученных при сравнительном изучении МТХ-В и МТХ-Ебеве, установлено, что препараты практически идентичны как по показателям «острой» токсичности, так и по результатам «субхронической» токсичности.

*С.С. Коробов, Е.В. Давыдов, В.Ю. Шленский*

### **ОПЫТ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ.**

*Ветеринарная клиника «Велес-Текстильщики», «Россолимо», Москва*

**Введение.** Саркомы мягких тканей (СМТ) – злокачественные опухоли, которые представляют определенную сложность в лечении, особенно когда новообразование инвазирует окружающие (в том числе подлежащие) ткани. Одним из основных методов лечения СМТ является оперативное удаление, но при распространенном процессе и инвазии в окружающие ткани возникают сложности при резекции опухоли и повышается риск рецидивирования, что приводит к ухудшению прогноза. С целью повышения результатов лечения таких больных нами был применен метод Фотодинамической терапии (ФДТ) в неoadьювантном режиме.

**Цель исследования.** Оценить возможность предоперационного применения ФДТ при лечении СМТ.

**Материалы и методы.** Пациенты – кошки (n=12), возраст от 5 до 15 лет, опухоли – диаметр от 4 до 10 см, плотные, бугристые, инвазивный рост в окружающие ткани. Фотосенсибилизатор – фотодитазин. Источник лазерного излучения 660 нм, мощность от 0,1 до 2 Вт.

**Результаты.** В предоперационном режиме применили Фотодинамическую терапию (ФДТ) с фотосенсибилизатором Фотодитазин (Хлорин Е6), в дозе 1 – 2,5 мг/кг, который вводился за 3 часа до облучения. Доза облучения составляла от 400 до 500 Дж. Перед облучением проводилась флюоресцентная диагностика. После ФДТ опухоль уменьшалась в размере и отделялась от подлежащих тканей, затем проводили оперативное удаление новообразования. Период наблюдения за пациентами составляет на данный момент от 1 месяца до 2 лет.

**Выводы.** Применение ФДТ в неoadьювантном режиме позволяет уменьшить размер опухоли, отделить ее от подлежащих тканей, что повышает резектабельность новообразования, увеличивает безрецидивный период и улучшает прогноз. Необходимы дальнейшие исследования в этой области.

*Д.И. Корытова, Н.Д. Олтаржевская, В.П. Сокурено, И.В.Гусев, А.Д. Кузнецов*

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ДИСКОВ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ С ДЕРИНАТОМ И ЭКСТРАКТОМ ЧЕРНИКИ ПРИ КОНФОРМНОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ РОТОГЛОТКИ И ПОЛОСТИ РТА**

*ООО «Колетекс», Москва*

*ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург*

**Цель исследования.** Профилактика и лечение радиоэпителиита полости рта и ротоглотки при конформной лучевой терапии опухолей головы и шеи.

**Задачи исследования.** Оценить эффективность высокоструктурированных дисков «Колегель-ДНК-Ч-диск» на основе альгината натрия с деринатом и экстрактом черники для профилактики и лечения лучевых реакций и осложнений слизистых дна полости рта и ротоглотки при конформной лучевой терапии.

**Материалы и методы.** Исследуемая группа – 28 пациентов с местнораспространенным раком орофарингеальной области использовали высокоструктурированные диски «Колегель-ДНК-Ч-диск» ежедневно с первого дня лучевого лечения за 30 – 40 минут до сеанса конформной лучевой терапии и 3 – 4 раза в день после сеанса лучевой терапии. Больной самостоятельно закладывал исследуемую форму геля в полость рта, после предварительного использования фиторастворов (полоскания). Исследуемые диски «Колегель-ДНК-Ч-диск» применяли по окончании лучевой терапии и в послелучевом периоде 2 – 3 раза в день в течение 1 месяца. Группа контроля 30 пациентов больных с аналогичной локализацией опухоли, получавшие общепринятые стандартные меры профилактики радиационного поражения слизистой орофарингеальной зоны (масляная болтушка).

**Результаты.** Побочные реакции, в т.ч. аллергические, при длительном приеме дисков «Колегель-ДНК-Ч-диск» не зарегистрированы ни у одного больного. Радиационное поражение слизистой дна полости рта и ротоглотки 1 – 2 степени наблюдали у 21 (75 %); радиоэпителиит 3 степени – у 6 (21,4 %); 4 степени – у 2 (3,6 %). Таким образом преобладали легкие и средние степени тяжести радиационного поражения слизистой, а частота развития тяжелого мукозита достоверно снизилась по сравнению с пациентами, получавшими общепринятые стандартные меры профилактики радиационного поражения слизистой орофарингеальной зоны.

**Выводы.** Использование материалов высокоструктурированных дисков «Колегель-ДНК-Ч-диск» на основе альгината натрия с деринатом и экстрактом черники у конкретной группы пациентов с первичной локализацией злокачественной опухоли в области ротоглотки и полости рта при конформной лучевой терапии обеспечило снижение частоты развития радиационного поражения слизистой, возможность эскалации суммарной очаговой дозы, уменьшение частоты перерывов в лучевом лечении, сокращение сроков восстановления слизистой в труднодоступных для лекарственных препаратов областях орофарингеальной области.

*Л.И. Корытова, О.В. Корытов, Н.Д. Олтаржевская, М.О. Мясникова, Е.А. Маслюкова*

**ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕРИАЛА ГИДРОГЕЛЕВОГО НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ С Е-АМИНОКАПРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ЛИДОКАИНОМ У ОПЕРАБЕЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ РМЖ.**

*ООО «Колетекс», Москва*

*ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург*

**Актуальность.** Одним из постоянных ранних послеоперационных осложнений мастэктомии является лимфорея, связанная с механическим пересечением большого количества лимфатических сосудов различного калибра.

**Цель исследования.** Уменьшение числа послеоперационных осложнений, сокращение сроков и объемов послеоперационной лимфорей.

**Результаты и выводы.** У пациенток, перенесших оперативное вмешательство в объеме простой мастэктомии (56) средний объем кровопотери в постоперативный период составил 100 мл, (от 50 до 150). При радикальных операциях (64 пациентки) этот показатель был выше – 150 мл (от 100 до 200). Лимфорея составила около 1500 мл за время наблюдения и в среднем оканчивалась к 12 – 15 суткам. Для пациенток, которым применялся материал гидрогелевый на основе альгината натрия с Е-аминокапроновой кислотой и лидокаином соответствующие показатели кровопотери оказались на уровне 75 (от 50 до 100 у 21 пациентки) и 100 (50 – 150 у 38 пациенток) мл соответственно, а лимфорея составила 800 – 900 мл в течение 7 – 9 дней, после чего она прекращалась. Отмечена тенденция к сокращению сроков заживления ран и приживления кожных лоскутов на 5 – 7 дней, что было обусловлено снижением объема и продолжительности лимфорей, соответственно снизилось время нахождения в стационаре, что в свою очередь позволило продолжить необходимое противоопухолевое лечение в более ранние сроки. Так же отмечено, что снизилась степень выраженности лимостазов и степень ограничения подвижности верхней конечности в плечевом суставе в связи с формированием рубцов меньшей плотности.



*Д.И. Корытова, С.Д. Иванов, В.Г. Красникова, А.В. Мешечкин, Р.М. Жабина*

### **ИНДЕКС РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ГЛИОБЛАСТОМНОЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

*ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург*

**Цель исследования.** Улучшение результатов комбинированного лечения больных глиальными опухолями головного мозга, путем определения предиктивных маркеров ответа на лучевую терапию.

**Материалы и методы.** Работа основана на анализе результатов комплексного обследования и комбинированного лечения 21 пациента с первичными злокачественными новообразованиями головного мозга в ФГБУ «РНЦРХТ». По результатам гистологического исследования опухоли – глиобластома четвертой степени злокачественности. Возраст пациентов варьировал от 32 до 73 лет, в среднем – 54 лет. Опухоли локализовались в полушариях головного мозга и занимали лобную долю у 3 пациентов, височную – у 7 пациентов, теменную – у 4, две доли и более – у 7 пациентов. Индекс Карновского колебался в пределах от 70 % до 95 %. Объем хирургического лечения включал субтотальное удаление опухоли у 95 % пациентов, у 5 % пациентов была проведена только биопсия. В комплекс лечебных мероприятий входили послеоперационная лучевая и химиотерапия. При лучевой терапии суммарные очаговые дозы варьировали от 57 до 64 Гр. Лечение проводилось на фоне химиотерапии у 95 % пациентов. В связи с тем, что чувствительность к темодалу была выявлена не у всех больных, 6 (30 %) пациентов получали темодал; 5 (25 %) пациентов – ломустин с винкристином; мустофоран – 2 (10 %) пациентов; 7 (35 %) пациентов получали другие комбинации химиотерапевтических препаратов. Перед началом лечения у всех пациентов определялся индекс радиочувствительности периферической крови и, в зависимости от значения этого показателя, всех пациентов разделили на 2 группы.

**Результаты.** В 1-й группе (14 больных) значение индекса радиочувствительности было выше 1, что позволило отнести пациентов к радиочувствительным и ожидать более успешных результатов лечения. Во 2-й группе (7 больных) предиктор радиочувствительности был ниже 1, что указывало на возможное снижение эффективности лучевой терапии. В 1-й группе продолжительность жизни варьировала в пределах от 5 до 157 месяцев, средняя продолжительность жизни составила –  $29 \pm 8$  месяцев; во 2-й группе – от 1 до 16 месяцев, средняя продолжительность жизни в этой группе –  $9 \pm 3$  месяца соответственно.

**Выводы.** Таким образом, метод определения радиочувствительности периферической крови позволяет решить важнейшие диагностические задачи, связанные с предсказанием эффективности лучевой терапии у пациентов с первичными злокачественными опухолями головного мозга и дает возможность спрогнозировать продолжительность жизни у данной категории больных.

*С.Н. Корякин, С.Е. Ульяненко, В.А. Ядровская*

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ЗОЛОТОСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ФОТОН-ЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ**

*МРНЦ им. А.Ф. Цыба, Обнинск*

**Цель исследования.** Оценка поглощенной дозы в опухоли за счет воздействия вторичного излучения, образующегося при взаимодействии золота с рентгеновским излучением, и изучении динамики накопления в тканях лабораторных животных золотосодержащих соединений на основе гиалуроновой кислоты.

**Материалы и методы.** Расчеты поглощенной дозы в опухоли проводили с использованием программы MCNP5. Динамику накопления в тканях лабораторных животных соединений с концентрацией золота 20 мг в 1 мл изучали на мышцах-самцах (СВА × С57Bl6) массой 20 – 22 г с привитой в правую заднюю лапку меланомой В-16. Определение содержания золота в образцах проводили с использованием оптического эмиссионного метода на приборе ICP-OES.

**Результаты и выводы.** Анализ результатов показал, что на всем интервале исследования золото по объему опухоли распределено не равномерно. Для двукратного увеличения поглощенной дозы за счет фотон-захватных событий необходима концентрация золота 10 мг/г ткани. Такое высокое содержание золота в опухоли в наших исследованиях получено не было. При 4-кратном внутриопухолевом введении удалось достичь концентрации золота 1 мг/г, что позволит получить увеличение поглощенной дозы около 10 %.

*Исследование поддержано грантом РФФИ 14-44-03084.*

*Е.Н. Кособокова, А.И. Щербаков, М.В. Пинюгина, М.Т. Зангиева, В.С. Косоруков*

#### **АНТИТЕЛА КАК ВЕКТОРНАЯ МОЛЕКУЛА ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ** *ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

При введении традиционных лекарственных форм препаратов (капсулы, таблетки, инъекции и др.) не удается избежать колебаний концентраций действующего вещества в биологических жидкостях. Отсутствие локальной направленности и краткосрочная сохранность препарата в месте действия (в микроокружении злокачественного образования), необходимость использования высоких доз заставляет исследователей искать и разрабатывать системы адресной доставки и длительного действия лекарственных средств и биологических молекул. Такая система предполагает снижение дозы лекарственного препарата и увеличение интервала между введениями, что повлечет за собой уменьшение токсичности, повышение переносимости пациентом и усиление терапевтического эффекта.

В качестве векторных молекул могут выступать моноклональные антитела. Разработанные нами гуманизированные МКА Фитогермаб против Her2/neu антигена были успешно конъюгированы с липосомами. Полученные иммунолипосомы нагружались доксорубицином. В качестве модели для изучения и цитотоксического действия использовались клетки линии SK-BR-3, экспрессирующие антиген Her2/neu.

Анти-Her2/neu-иммунолипосомы специфически связывались с 95 % антиген<sup>+</sup> клеток SK-BR-3 и не реагировали с антиген<sup>-</sup> клетками. В МТТ тесте анти-Her2/neu-иммунолипосомы оказывали цитотоксическое действие на клетки SK-BR-3. Эффект был дозозависимым.

Следующим направлением текущих исследований стала разработка модели доставки биологической молекулы (например, цитокинов). Мы разработали новую конструкцию слитного рекомбинантного белка (СРБ) на основе гуманизированные МКА против Her2/neu антигена и интерферона- $\alpha$ -2b человека. Такой слитный белок совмещает функции обоих компонентов: МКА к Her2 обеспечат направленную доставку и блокирование рецептора Her2, а цитокиновый компонент реализует собственное биологическое действие в зоне микроокружения опухоли. Достижение искомого результата позволит оценить перспективность создания рекомбинантных терапевтических белков на основе МКА, слитных с цитокиновым доменом для Her2 экспрессирующих опухолей. При получении таких белков будет использована разработанная нами ранее относительно простая, безопасная и малозатратная технология производства МКА к Her2 из биомассы транзитивно трансфицированных растений (*Nicotiana benthamiana*), адекватная генно-инженерная комбинация МКА и других биологически активных доменов. Оценка биологических эффектов полученного СРБ будет проведена в сравнении с немодифицированными аналогами.

*Л.В. Кострюкова, О.М. Ипатова, В.Н. Прозоровский, Н.В. Медведева, Е.Г. Тихонова*

#### **ИЗМЕНЕНИЕ КОЖНОЙ ФОТОТОКСИЧНОСТИ ХЛОРИНА Е6 ПРИ ЕГО ВВЕДЕНИИ В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ** *ИБМХ, Москва*

**Актуальность.** Одним из новых методов, показавшим свою перспективность в лечении и диагностики онкозаболеваний, является фотодинамическая терапия (ФДТ). Известно, что успех этого метода определяется выбором фотосенсибилизатора (ФС), обеспечивающего не только высокую селективность накопления препарата в опухоли, но и низкую фототоксичность, проявляющуюся в виде ожогов кожных покровов вызванных не выведенными из организма остатками ФС.

**Материалы и методы.** В ИБМХ разработана новая лекарственная форма хлорина Е6, включенного в фосфолипидные наночастицы, размером до 30 нм, как систему транспорта (Хлорин-НФ). Для характеристики препарата нами была проведена оценка его остаточной фототоксичности при облучении участков кожи бедра здоровых мышей. В предварительных экспериментах было установлено, что оптимальный интервал между введением ФС (в дозе 5 мг/кг) и проведением сеанса ФДТ составляет 3 часа.

**Результаты.** Фототоксичность характеризовали измерением объема отека и временем его сохранения после облучения. При облучении через 3 часа после введения Хлорина-НФ и «свободной» субстанции время сохранения отека, индуцированного ожогом кожи из-за присутствия в ней остаточных количеств ФС, было одинаковым как для препарата, так и для субстанции и составляло  $3,6 \pm 0,8$  суток. При облучении через 3 часа после введения Хлорина-НФ и «свободной» субстанции время сохранения отека было одинаково и составило  $3,6 \pm 0,8$  суток. Однако через сутки после облучения объемы отека у животных, которым вводили Хлорин-НФ были на 19 % выше по сравнению с контролем (без ФС), а в опыте со «свободной» субстанцией на 37 %.

**Выводы.** Кожная фототоксичность остаточных количеств ФС при введении препарата Хлорин-НФ почти в 2 раза меньше, чем при использовании «свободной» субстанции.

*Н.В. Красногорова<sup>1</sup>, Д.В. Новиков<sup>1</sup>, А.В. Калугин<sup>1</sup>, Е.Ю. Конторщикова<sup>2</sup>, В.В. Новиков<sup>1</sup>, Ж.А. Казацкая<sup>1</sup>*  
**ОНП rs396991 ГЕНА CD16a АССОЦИИРОВАН  
 С ВЫСОКИМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

<sup>1</sup>ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

<sup>2</sup>НиЖГМА, Нижний Новгород

**Актуальность.** Белок FcγRIIIa (CD16a) относится к семейству рецепторов Fcγ, которые играют важную роль в реализации воспаления. В гене CD16a обнаружен ОНП rs396991 (V176F). Известно, что носители аллели T(F) плохо отвечают на терапию rituximab (анти-CD20) при различных заболеваниях, включая онкологические, в отличие от носителей аллели G(V).

**Цель работы.** Оценка распределения генотипов среди здорового населения и больных колоректальным раком.

**Материалы и методы.** В работе использовали периферическую кровь 78 лиц без онкозаболеваний и 100 больных колоректальным раком. ОНП rs396991 определяли методом ПЦР.

**Результаты.** Частоты аллелей у лиц без онкологических заболеваний составили 64 % и 36 % для G и T соответственно. Генотип GG выявлен у 41 человека (52,56 %), GT – 18 человек (23,08 %), TT – 19 человек (24,36 %). Частоты аллелей у больных колоректальным раком составили 15 % и 85 % для G и T соответственно. Генотип GG был обнаружен у 13 человек (13,00 %), GT – 5 человек (5,00 %), TT – 82 человека (82,00 %).

**Выводы.** Таким образом, аллель T(F) встречается у больных колоректальным раком в 2,5 раза чаще ( $\chi^2 = 59$ ;  $p < 10^{-10}$ ) и может рассматриваться в качестве аллели риска (OR = 9,7; 95% CI: 5,8 – 16,1). Разработанный тест может быть использован в качестве прогностического при назначении терапии rituximab.

*Е.В. Кузнецкая, О.С. Тимошенко, Н.И. Соловьева*

**АПФ ПРИ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ**

*ИБМХ, Москва*

**Актуальность.** В настоящее время в число систем организма, вовлеченных в процесс канцерогенеза, внесена ренин-ангиотензиновая система (РАС). Локальные РАС обнаружены и в широком спектре опухолей человека. При опухолевой прогрессии наблюдается активация локальных опухолевых РАС, что выражается в повышенном образовании ангиотензина II (АП) под действием ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и экспрессии рецепторов АП типа 1.

**Цель работы.** Сравнительное исследование активности АПФ в образцах плоскоклеточной карциномы шейки матки и в образцах морфологически нормальных тканей, прилегающих к опухоли.

**Материалы и методы.** Активность АПФ определяли по расщеплению специфического субстрата Z-Phe-His-Leu. Работа проведена на 9 парных образцах.

**Результаты и выводы.** Сравнение активности АПФ в образцах опухолей с активностью АПФ в образцах прилегающей к опухоли ткани показало, что в образцах опухоли активность АПФ в 70 % случаев была существенно повышена (от 30 % до 300 %). В 20 % случаев активность АПФ была выше в образцах прилегающей к опухоли ткани, 10 % случаев – существенных различий не наблюдалось. Обнаруженная нами повышенная активность АПФ в опухолевой ткани подтверждает участие АПФ в развитии опухолевой прогрессии при плоскоклеточной карциноме шейки матки. Предполагается, что это может прогнозировать ухудшение исхода заболевания.

*С.А. Кузнецов, Л.Т. Мамедова, В.М. Сафронова, И.Ж. Шубина, М.В. Киселевский*

**ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК (МНК)  
 В ОТНОШЕНИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ (РЯ)**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

**Задачи исследования.** В работе изучали цитотоксическую активность лимфоцитов больных РЯ в отношении аутологичных опухолевых клеток.

**Материалы и методы.** МНК выделяли на градиенте фиколла (1,077 г/см<sup>3</sup>) из периферической крови больных РЯ (n=5). МНК инкубировали в полной культуральной среде (ПКС) RPMI-1640 при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 сут. Из образца опухолевой ткани получали опухолевые клетки РЯ, которые культивировали в ПКС. Цитотоксичность МНК оценивали с помощью МТТ-теста при соотношении Э/М (эффекторы/мишени, клетки РЯ и К-562) 1:1, 1:2, 1:5.

**Результаты.** Были получены краткосрочные культуры (5 – 6 пассажей, жизнеспособность до 4 мес.) клеток РЯ с различной морфологией, что соответствовало различным типам заболевания РЯ по клиническому диагнозу. После краткосрочной инкубации цитотоксичность МНК составила: 40 – 55 %, 50 – 60 %, 66 – 80 % против клеток РЯ и 43 – 60 %, 57 – 64 %, 68 – 85 % против К-562 (при Э/М 1:1, 1:2, 1:5, соответственно). Ранее было показано, что без предварительной инкубации НК-активность МНК не превышает 40 – 45 % (при Э/М=1:5).

**Выводы.** Цитотоксическая активность МНК в отношении аутологичных опухолевых клеток и клеток линии К-562 повышается при краткосрочном культивировании в стандартных условиях. Возможно, это связано с увеличением численности макрофагов и активации лимфоцитов продуцируемыми цитокинами.

*О.С. Кузнецова, А.В. Таллерова, С.В. Никитин, Л.П. Коваленко*

### **ЭФФЕКТЫ СНК-411 НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ В МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ LLC У МЫШЕЙ**

*ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва*

**Цель исследования.** Оценка влияния нового противоопухолевого производного 5-оксипириимидина СНК-411, ранее показавшего в экспериментах ингибирование роста опухоли LLC и цитостатический эффект в отношении линии К-562, на содержание цитокинов в модели LLC у мышей C57Bl/6.

**Материалы и методы.** Взвесь опухолевых клеток LLC имплантировали мышам согласно общепринятой методике. СНК-411 в дозах 25 и 50 мг/кг вводили через 48 часов после инокуляции опухоли в течение 7 дней. Мультиплексное исследование концентраций Th1/Th2 10 plex цитокинов в сыворотке крови мышей проводили на проточном цитометре. Сбор сыворотки у животных проводили путем декапитации на 9 сутки развития LLC. Статистическую обработку данных проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В сыворотке крови мышей на 9 сутки развития опухоли регистрировали значимое увеличение содержания IL-4 в 3,5 раза: IL-4,  $614,8 \pm 95,9$  пг/мл по сравнению с  $175,0 \pm 65,9$  пг/мл в контроле. В группах животных с имплантированной LLC, получавших СНК-411 в дозах 25 и 50 мг/кг, выявлено значимое снижение содержания IL-4 в 4,0 и 3,6 раза, IL-2 в 1,4 и 1,2 раза и IL-6 в 2,7 и 1,6 раза соответственно.

**Выводы.** Результаты, полученные в настоящей работе, раскрывают один из возможных механизмов противоопухолевой активности СНК-411, связанный со снижением продукции IL-4, коррелирующим с подавлением роста карциномы легкого *Lewis* и увеличением продолжительности жизни мышей.

*Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, А.А. Сергеев, К.А. Сережин, В.М. Бухман*

### **«СУБХРОНИЧЕСКАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛА НА КРЫСАХ.**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Лекарственное средство на основе производного индолокарбазола (ЛХС-1208) показало высокую противоопухолевую активность в эксперименте при рекомендованной эффективной терапевтической разовой дозе (ЭТД) для мышей – 25 мг/кг пятикратно (суммарная доза 125 мг/кг).

**Цель исследования.** Изучение «субхронической» токсичности ЛХС-1208 на крысах.

**Материалы и методы.** Работа проведена на 40 здоровых неинбредных беспородных крысах самцах, полученных из разведения ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Препарат (серии 110414 и 120414) растворяли в воде для инъекций до получения рекомендованной концентрации – 3,0 мг/мл, и вводили внутривентриально ежедневно 15-кратно в трёх дозах, рассчитанных исходя из максимально возможно введенного объема, соответствующего дозе 100 мг/кг, полученной в опытах по «острой» токсичности на крысах при внутривентриальном применении, увеличенной и уменьшенной в 2 раза соответственно: суммарная доза 200 мг/кг, разовая доза 13,3 мг/кг; суммарная доза 100 мг/кг, разовая доза 6,7 мг/кг; суммарная доза 50 мг/кг, разовая доза 3,3 мг/кг. Срок наблюдения за животными – 30 суток после последнего введения.

**Результаты.** Установлено, что ЛХС-1208 при ежедневном внутривентриальном применении в течение 15 дней в трех исследованных дозах (суммарные дозы 200 мг/кг, 100 мг/кг и 50 мг/кг) не вызывал гибели животных, не оказывал влияния на общее состояние животных, не вызывал внешних проявлений токсичности, не изменял поведенческие реакции животных, не вызывал изменений показателей периферической крови животных, не оказывал влияния на функциональное состояние печени, почек и поджелудочной железы. Показано, что ЛХС-1208 при ежедневном внутривентриальном применении в течение 15 дней в трех исследованных дозах (суммарные дозы 200 мг/кг, 100 мг/кг и 50 мг/кг) вызывал недозозависимые изменения на ЭКГ крыс: увеличение интервалов PQ и QT, понижение вольтажа зубца R и выпадение зубца R (нарушение сердечного ритма), что свидетельствует о нарушении электрической проводимости. Эти изменения могут расцениваться как признаки кардиотоксичности.

**Заключение.** На основании данных по изучению «субхронической» токсичности ЛХС-1208 на крысах препарат рекомендован для дальнейшего изучения.

*Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, А.А. Сергеев, К.А. Серезжин, В.М. Бухман*  
**«ОСТРАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА  
НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛА (ЛХС-1208)  
НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Цель исследования.** Изучение «острой» токсичности нового, разработанного в ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» противоопухолевого препарата ЛХС-1208 на мелких лабораторных животных (мыши, крысы) при двух путях введения.

**Материалы и методы.** Работа проведена на 276 здоровых мышах линии BDF<sub>1</sub>, полученных из питомника «Столбовая» и 100 здоровых неинбредных беспородных крысах, полученных из разведения ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина». Препарат серии 020913 растворяли в воде для инъекций до получения рекомендованной концентрации – 3,0 мг в 1 мл. Мышам ЛХС-1208 вводили внутривенно в диапазоне доз от 35 до 175 мг/кг, крысам – от 50 до 125 мг/кг; внутрибрюшинно мышам – от 50 до 200 мг/кг, крысам – от 60 до 100 мг/кг. Дозы препарата от 100 до 200 мг/кг мышам и от 80 до 125 мг/кг крысам разделяли на 2 – 3 введения с интервалом 2 – 3 часа (максимально возможные объемы при фиксированной концентрации).

**Результаты.** Изучена «острая» токсичность ЛХС-1208 при однократном внутривенном и внутрибрюшинном применении в диапазоне доз на мышах и крысах самках и самцах. Установлено отсутствие половых отличий для мелких лабораторных животных при однократном внутривенном и внутрибрюшинном применении. При применении ЛХС-1208 в фиксированной концентрации и максимально возможных объемах при внутривенном применении мышам и при внутривенном и внутрибрюшинном применении крысам гибели животных не наблюдалось, в связи с этим расчетные токсические дозы не получены. Гибель мышей при применении ЛХС-1208 при внутрибрюшинном применении наступала на 2 – 4 сутки на фоне сосудистых нарушений. Расчетные токсические дозы ЛХС-1208 при внутрибрюшинном применении мышам самкам и самцам практически одинаковы: для мышей-самок ЛД<sub>50</sub> – 143 (134÷170) мг/кг; для мышей самцов ЛД<sub>50</sub> – 143 (136÷159) мг/кг. У мышей и крыс, получавших ЛХС-1208 внутрибрюшинно во всех дозах, наблюдалось дозозависимое снижение массы тела, по сравнению с изменениями массы тела контрольных животных. У мышей и крыс, получавших лекарственное средство на основе производного индолокарбазола внутривенно, изменений массы тела животных по сравнению с контрольными животными не наблюдалось.

**Заключение.** На основании данных по изучению «острой» токсичности ЛХС-1208 на мелких лабораторных животных препарат рекомендован для дальнейшего изучения.

*А.А. Липенгольц<sup>1,2</sup>, Е.Ю. Григорьева<sup>1</sup>, А.В. Смирнова<sup>1</sup>, Е.Ю. Колдаева<sup>1</sup>, А.А. Черепанов<sup>1,2</sup>, В.Н. Кулаков<sup>2</sup>*  
**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА ВИСИПТАСТ**

*<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

*<sup>2</sup>ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, Москва*

**Актуальность.** Висмут является самым тяжелыми стабильным элементом с порядковым номером Z= 83. Поскольку вероятность взаимодействия рентгеновского излучения с атомами различных химических элементов пропорциональна Z<sup>5</sup>, то использование висмута в препаратах способно обеспечить максимальную эффективность бинарной лучевой терапии при лечении онкологических заболеваний.

**Цель и задачи исследования.** Сравнительное изучение острой токсичности нового препарата для бинарной лучевой терапии Висиптаст.

**Материалы и методы.** Препарат Висиптаст представляет собой 0,5 М водный раствор натриевой соли комплекса висмута с диэтилтриаминопетауксусной кислотой. Препарат сравнения – Дипентаст<sup>®</sup> (0,5 М водный раствор натриевой соли комплекса гадолиния с диэтилтриаминопетауксусной кислотой). В исследовании были использованы мыши BDF обоих полов с массой тела 21 – 22 грамма. Использовали 2 пути введения – внутримышечное и подкожное. Дозы введения препарата: 1,25 мМ/кг, 2,5 мМ/кг, 3,75 мМ/кг, 5 мМ/кг, 6,25 мМ/кг, 7,5 мМ/кг, 8,75 мМ/кг, 10 мМ/кг. Количество животных в группе – 6 особей.

Срок наблюдения за животными – 14 дней. Критериями оценки «острой» токсичности служили: число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации и патологические изменения в тканях и внутренних органах. Расчет токсических доз проводили с использованием метода пробит-анализа AnalystSoft Inc., Biostat. Пробит-анализ – метод Финни (Логнормальный закон распределения)

**Результаты и выводы.** Показано, что при внутримышечном введении LD<sub>50</sub> препарата Висиптаст составила 4,10±0,44 мМ/кг для самок и 4,06±0,44 мМ/кг для самцов, а при подкожном введении 6,00±0,58 мМ/кг и 5,81±0,57 мМ/кг соответственно. Токсичность препарата Висиптаст удовлетворяет требованиям бинарной лучевой терапии, однако он является более токсичным, чем препарат сравнения Дипентаст<sup>®</sup> (15,20±1,4 мМ/кг и 17±1,54 мМ/кг при внутримышечно и подкожном введении соответственно).

*А.А. Липенгольц<sup>1,2</sup>, А.А. Черепанов<sup>1,2</sup>, Е.Ю. Григорьева<sup>1</sup>, И.Н. Шейно<sup>2</sup>, В.Н. Кулаков<sup>2</sup>*

### **ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БИНАРНОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, Москва

Бинарная лучевая терапия представляет собой разновидность лучевой терапии, использующая для формирования необходимого распределения поглощенной дозы в мишени специальный препарат, содержащий в своем составе химический элемент, взаимодействующий с внешним излучением с большей вероятностью, чем элементы, составляющие обычную биологическую ткань, такие как углерод, кислород, азот, водород и т.д. Такое преимущественное взаимодействие приводит к локальному увеличению поглощенной дозы внешнего ионизирующего излучения в области локализации такого препарата, что позволяет создавать в мишени, содержащей препарат, тумороцидную величину поглощенной дозы при толерантной величине поглощенной дозы в окружающих нормальных тканях. Эффективность бинарной лучевой терапии во многом зависит от соотношения концентрации используемого препарата в опухоли и в окружающих нормальных тканях. К настоящему моменту попытки создать препарат, способный избирательно накапливаться в опухолевых клетках в количествах, необходимых для бинарной лучевой терапии – не увенчались успехом. Однако обеспечение необходимого соотношения препарата в опухолевых и нормальных тканях при бинарной лучевой терапии возможно не только за счет физиологических свойств опухолевых клеток, но и за счет морфологических особенностей опухоли, как-то нарушение гематоэнцефалического барьера при опухолях мозга и гиперваскуляризация определенных видов опухолей. Многие виды опухолей представляют собой обширные участки некротизированных тканей, сквозь которые проходят многочисленные кровеносные сосуды, окруженные сравнительно тонким слоем живых делящихся опухолевых клеток. Таким образом, для таких видов опухолей возможно применение бинарной лучевой терапии с внеклеточными препаратами, не обладающими собственной тропностью к опухоли, но малотоксичными и способными циркулировать в крови в течение времени, необходимого для проведения облучения внешним ионизирующим излучением. Наши ранее проведенные исследования с гадолиниевым контрастным препаратом для магнитно-резонансной томографии, а также экспериментальные работы зарубежных исследователей с йодными рентгеноконтрастными препаратами и наночастицами золота показывают высокую эффективность бинарной лучевой терапии с внеклеточными препаратами при их системном введении при лечении отдельных видов опухолей.

*М.М. Луккина<sup>1,2</sup>, И.Н. Дружкова<sup>1</sup>, В.В. Дуденкова<sup>1,2</sup>, М.В. Ширманова<sup>1</sup>, Е.В. Загайнова<sup>1,2</sup>*

### **IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ КОФАКТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ**

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Н.Новгород

<sup>2</sup>ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Н.Новгород

**Актуальность.** Известно, что опухолевые клетки имеют гликолитический метаболизм, который способствует их выживаемости и пролиферации.

**Целью работы.** Разработка методики анализа метаболических кофакторов НАДН и ФАД с помощью микроскопии временного разрешения FLIM в опухолевых и нормальных клетках in vitro.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на опухолевых линиях HeLa Kyoto, HT29 и HCT116, CT26 и фибробластах человека и мыши. Время-разрешенные изображения получали на лазерном сканирующем микроскопе LSM710 (Carl Zeiss, Германия) с опцией FLIM (Becker&Hickl, Германия).

**Результаты.** В ходе исследования подобраны параметры регистрации времен жизни флуоресценции НАДН и ФАД в клетках, получены кривые затухания флуоресценции и выполнен анализ коротких и длинных компонент, а также их вкладов. Выявлены различия во временах жизни флуоресценции кофакторов в опухолевых и нормальных клетках, обусловленные различным состоянием и содержанием изучаемых молекул, что вероятно связано с особенностями энергетического метаболизма и микроокружения. Проведено предварительное исследование метаболических изменений в опухолевых клетках под действием химиотерапии.

**Заключение.** Разработанная методика представляет интерес для изучения особенностей метаболизма опухолевых клеток и их ответа на лечение.

*М.Н. Макарова, Л.М. Обухова, Е.И. Ерлыкина, Т.Н. Горшкова*

### **ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ С БИОХИМИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ**

*ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Нижний Новгород*

**Актуальность.** Электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) – интегральный показатель состояния мембран, характеризующий гомеостаз организма. Показано изменение ЭФПЭ крови при различных заболеваниях, однако возможность применения того параметра для ранней диагностики злокачественных новообразований на сегодняшний день не исследована.

**Цель работы.** Изучение ЭФПЭ при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей и их связи с биохимическими параметрами плазмы крови.

**Материалы и методы.** Изучена ЭФПЭ крови 42 больных злокачественными новообразованиями эпителиальных тканей, контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц. Измерение ЭФПЭ производили методом микроэлектрофореза. Определение белковых фракций плазмы крови, содержания холестерина, триацилглицеролов, ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП, концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина, макроэлементов проводили на анализаторе «КонеЛаб 20/20i» (Финляндия). Содержание С-пептида, иммунореактивного инсулина оценивали методом иммунохемилюминисценции на анализаторе «Liaison» (Италия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ BIOSTAT.

**Результаты.** При онкологических заболеваниях ЭФПЭ была снижена относительно нормы ( $1,75 \pm 0,04$  мкм·см/В·с) более, чем в 2 раза (на 59 %) ( $0,72 \pm 0,12$ ). При проведении корреляционного анализа в общем массиве биохимических показателей, включающих параметры онкологических больных и практически здоровых людей, было выявлено только две статистически значимых взаимосвязи ЭФПЭ: с уровнем иммуноглобулина М ( $r = -0,425$ ) и содержанием фосфора ( $r = -0,642$ ) и кальция ( $r = 0,390$ ) в плазме крови. При определении коэффициента корреляции Пирсона отдельно для выборок данных здоровых людей и онкологических больных также было показано, что для данных параметров взаимосвязь имеет одинаковый характер. При осуществлении корреляционного анализа отдельно для каждой из выборок было показано, что для здоровых людей ЭФПЭ взаимосвязано с большинством белковых фракций:  $\alpha 1$ глобулинов ( $r = 0,480$ );  $\alpha 2$  ( $r = -0,410$ );  $\beta$  ( $r = -0,449$ ). Для ЭФПЭ больных злокачественными новообразованиями эпителиальных тканей таких значимых взаимосвязей выявлено не было. Напротив, у онкологических больных ЭФПЭ статистически достоверно связана с уровнем иммуноглобулина G ( $r = -0,430$ ), чего не наблюдается для здоровых людей. У онкологических больных выявлены значимые взаимосвязи ЭФПЭ с уровнем натрия ( $r = -0,351$ ), калия и ( $r = 0,400$ ) и магния ( $r = -0,420$ ), чего не выявлено в контрольной группе.

**Выводы.** Значительное снижение электрофоретической подвижности эритроцитов крови при злокачественных опухолях эпителиальных тканей обусловлено рядом специфических нарушений биохимических параметров плазмы крови при данной патологии и может служить интегральным скрининговым методом для ранней диагностики злокачественных новообразований.

*Н.А. Максимова, Л.Г. Сергостьяни, М.Г. Ильченко, М.И. Курьишова*

### **ЗНАЧЕНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ (УЗИ) НА ЭТАПАХ СКРИНИНГА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДНЕЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ (В РНИОИ)**

*ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону*

**Задача исследования.** Для уточнения степени распространенности процесса при опухолях кожи был проведен ретроспективный анализ данных комплексного УЗИ с применением режимов цветового, энергетического доплеровского картирования 66 пациентов, направленных из поликлиники РНИОИ при проведении дней профилактики онкозаболеваний кожи.

**Материалы и методы.** Всего было произведено 198 УЗИ, включающих УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства, мягких тканей, регионарных лимфоузлов. Возраст пациентов 30 – 75 лет. Исследования проводились на аппаратах экспертного и среднего класса с использованием линейных датчиков, работающих в диапазоне 7,5 – 15 МГц, и конвексных датчиков 3,5 – 5,5 МГц.

**Результаты.** У 1 пациента (1,5 %) было выявлено метастатическое поражение печени, у 8 пациентов (12,2 %) регистрировалось увеличение регионарных лимфоузлов, из них у 3 (37,5 %) воспалительного характера, у 5 (62,5 %) метастатическое поражение лимфоузлов. В ходе проведения УЗИ была выявлена сопутствующая патология: диффузные изменения поджелудочной железы у 24 пациентов (36,3 %), гепатомегалия, жировой гепатоз у 12 (18,1 %), конкременты желчного пузыря у 4 (6,2 %), кисты печени у 4 (6,2 %), гемангиомы печени у 2 (3,0 %), полипы желчного пузыря у 1 (1,5 %), липомы мягких тканей у 2 (3,0 %).

**Заключение.** Таким образом, УЗИ является информативным, неинвазивным, вспомогательным методом диагностики, позволяющим клиницистам-онкологам *ex tempore* получить дополнительную информацию при проведении «дней профилактики онкозаболеваний кожи» и определить тактику дальнейшего ведения и индивидуальный прогноз заболевания.

*Н.А. Максимова, А.С. Егорова, М.Г. Ильченко, М.Н. Дурицкий*

### **РОЛЬ УЗ ДИАГНОСТИКИ В ВЫЯВЛЕНИИ ОНКОПАТОЛОГИИ ОРГАНОВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА.**

*ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону*

**Цель и задачи исследования.** Задачами ультразвуковой диагностики (УЗИ) органов брюшной полости (ОБП) являются выявление первичного опухолевого очага, метастатического поражения органов, а также сопутствующей патологии.

**Материалы и методы.** С целью ранней диагностики абдоминальной патологии было выполнено УЗИ ОБП 212 пациентам в рамках проведенного «Дня профилактики онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта» в РНИОИ. Исследования проводились на аппаратах экспертного и среднего класса с использованием конвексных датчиков, работающих в диапазоне 3,5 – 5,5 МГц.

**Результаты.** Объемное образование брюшной полости было выявлено у 1 больного (0,5 %), у 1 пациента признаки диссеминации по брюшине (0,5 %), доброкачественные образования печени – кисты и гемангиомы – у 5 (2,4 %) и 6 (2,8 %) пациентов соответственно, полипы желчного пузыря были выявлены у 4 пациентов (1,9 %), диффузные изменения поджелудочной железы у 84 больных (39,6 %), гепатомегалия и жировой гепатоз у 71 пациента (33,4 %), конкременты желчного пузыря у 19 больных (9 %), спленомагалия у 2 пациентов (0,9 %), без патологии – 19 человек (9 %).

**Вывод.** Таким образом, УЗИ является информативным, вспомогательным методом в диагностике абдоминальной патологии.

*Т.Ф. Маливанова*

### **ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ (TNF $\alpha$ ) И РМЖ**

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Фактор некроза опухолей (TNF $\alpha$ ) – это многофункциональный цитокин, который принимает участие во всех этапах опухолевого роста (от инициации до прогрессирования заболевания) и ассоциирован с рядом онкологических заболеваний. Считается, что в высоких концентрациях он способен вызывать некроз опухоли, тогда как в низких концентрациях – пролиферацию опухолевых клеток. В силу этого, в онкологии разрабатываются и применяются препараты как на основе TNF $\alpha$ , так и анти-TNF $\alpha$ . Поскольку известно, что полиморфизм промоторной области гена фактора некроза опухолей TNF $\alpha$  регулирует уровень эндогенной экспрессии этого цитокина, актуальным является изучение влияния полиморфизма гена TNF $\alpha$  на предрасположенность к РМЖ и на прогноз заболевания.

**Материалы и методы.** Методом аллель-специфической ПЦР и ПЦР-ПДРФ нами были проанализированы сайты одонуклеотидных замен -239(G/A)TNF и -308(G/A)TNF у 516 больных РМЖ и 226 женщин контрольной группы.

**Результаты и выводы.** Нами не обнаружено ассоциации с предрасположенностью к РМЖ, в тоже время анализ 10-летних данных указывает на влияние полиморфизма гена TNF $\alpha$  на общую выживаемость больных II стадией РМЖ и с рецептор-положительным статусом опухоли (РЭ+РП+). Наблюдается ассоциация с уровнем индекса пролиферации (Ki-67), наличием отдаленных метастазов (M1) и степенью выраженности депрессии у больных РМЖ. Сделано предположение, что полиморфизм гена TNF $\alpha$  оказывает влияние 1) на реализацию собственного противоопухолевого действия эндогенного TNF; 2) влияет на индивидуальную чувствительность к стандартной терапии (в частности, к гормонотерапии); 3) генотипирование по сайтам одонуклеотидных замен -238(G/A)TNF и -308(G/A)TNF может быть использовано для индивидуализации применения иммуномодуляторов в терапии РМЖ.

*И.А. Мамичев, Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, А.Б. Равчеева, А.В. Конухова, Б.Е. Полоцкий*

### **TUBB3 КАК ВОЗМОЖНЫЙ МАРКЕР МАЛИГНИЗАЦИИ**

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Бета-тубулин, структурный белок микротрубочек, представлен в организме человека семью изоформами. Одной из этих изоформ является бета-III тубулин (TUBB3), который не встречается в большинстве здоровых тканей организма за исключением нейронов, эмбриональных тканей и клеток Сертоли, но зачастую экспрессируется в солидных опухолях.

**Цель работы.** Проверка гипотезы авторов о том, что экспрессия TUBB3 в окружающей опухоль морфологически нормальной ткани легкого возможна и свидетельствует о местной распространенности опухоли.

**Материалы и методы.** Иммунофлуоресцентным методом с использованием проточной цитофлуориметрии, разработанным в лаборатории, проведено сравнение экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и в морфологически нормальной ткани легкого, прилежащей к опухоли. Одноклеточные суспензии инкубировали с первичными (ab7751) антителами в течение ночи и затем 1,5 часа с вторичными (ab98729) антителами, конъюгированными с DyLight650. Показатели экспрессии TUBB3 анализировали с помощью программы FlowJo статистическим методом Колмогорова-Смирнова. Всего проанализировано 40 хирургических биопсийных образцов тканей. Образцы по уровню экспрессии TUBB3 были разделены на 3 группы: высокий – количество специфически окрашенных клеток в опухоли  $\geq 40$  %, низкий –  $< 40$  %, фоновый/нулевой –  $< 20$  %.

**Результаты.** Во всех случаях экспрессия TUBB3 в ткани НМРЛ превышала экспрессию этого белка в прилежащей нормальной ткани легкого. Экспрессия TUBB3 выявлена в 82 % образцов НМРЛ (средний показатель составил  $44,9 \pm 14,4$  % исследованных клеток). Высокий ( $53,7 \pm 7,7$  %) и низкий ( $29,0 \pm 8,1$  %) уровни экспрессии TUBB3 выявлены в 53 % и 29 % опухолей соответственно. В морфологически нормальной ткани легкого экспрессия TUBB3 детектируется лишь в 39 % исследованных образцов, причем во всех этих случаях уровень экспрессии TUBB3 был низким со средним показателем  $29,0 \pm 8,1$  %.

**Выводы.** Сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака лёгкого, а также в нормальной ткани органа, окружающей первичный опухолевый очаг в легком, демонстрирует клиническую значимость этого белка как прогностического маркера метастатического потенциала и местной распространенности немелкоклеточного рака лёгкого.

*Исследование поддержано грантами РФФИ (№№13-04-01004-а, 12-04-00028-а, 14-04-31734-мол-а) и грантом РАН (ФИМТ-2014-205).*



*Е.А. Маслюкова, Л.И. Корытова, С.В. Одинцова, А.А. Поликарпов, Р.М. Жабина*

### **ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ И ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ У БОЛЬНЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*ФГБУ «РНЦРХТ», Санкт-Петербург*

**Актуальность.** Воспалительный (инфильтративно-отечный) рак составляет приблизительно 5 % всех случаев РМЖ.

**Цель исследования.** Повышение эффективности комбинированного химиолучевого лечения больных воспалительным РМЖ, с применением химиоэмболизации внутренней и наружной грудных артерий, с последующей радикальной лучевой терапией и химиотерапией.

**Материалы и методы.** За период 2000 – 2014 г. у 72 больных воспалительной формой рака молочной железы произведено комбинированное лечение, включающее системную и внутриартериальную химиотерапию, облучение. Рентгеноваскулярные вмешательства осуществляли путем эмболизации или путем химиоэнфузии в грудные артерии. Контрольную группу составили 89 пациенток.

**Результаты и выводы.** Из исследовательской группы 21 пациенток были прооперированы, в гистологических образцах в семи случаях обнаружены опухолевые клетки, в 14 случаях опухолевые клетки не выявлены. В группе прооперированных больных, у которых в послеоперационном материале не обнаружены опухолевые клетки, выживаемость была статистически выше, чем в группе, где сохранялись опухолевые клетки в гистологических образцах (Gehans test,  $p < 0,05$ ). В сравнении с контрольной группой выживаемость больных, которым выполнена ангиография и химиоэмболизация (химиоэнфузия) с последующей радикальной лучевой терапией была статистически выше (Gehans, Cox's test,  $p < 0,05$ ).

*Е.А. Маслюкова, А.В. Бондаренко, Л.И. Корытова, Е.М. Обухов, С.И. Заброда, О.В. Корытов*

### **СОВРЕМЕННАЯ КОНФОРМНАЯ ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*ФГБУ «РНЦРХТ», Санкт-Петербург*

**Цель исследования.** Сравнительный анализ результатов дозо-объемного распределения на мишень и критические структуры (сердце и легкие) у больных РМЖ при проведении конформной лучевой терапии.

**Материалы и методы.** В исследование включены 78 пациенток РМЖ, у которых проводилась конформная лучевая терапия на аппарате PRECISE. У 42 – использовались плавающие поля между верхним фигурным полем и тангенциальными полями, в контрольной группе у 36 больных – холодная стыковка. Оценку дозо-объемного распределения оценивали по следующим показателям: V10 для сердца, V18 для ипсилатерального легкого, процентная доза на RTVdvh для МЖ, подмышечных, надключичных и подключичных лимфоузлов.

**Результаты.** Дозо-объемные ограничения V10 на сердце составили 0 – 10 % в группе 2 и 0 – 8 % в группе 1 у больных с правосторонней локализацией (Мсредняя=1,7 % и 1,8 % соответственно). У больных с левосторонним РМЖ V10 варьировал от 10 – 35 % – 1 группа и 12 – 39, Мср=20,4 % и 24,3 %. V18 на ипсилатеральное легкое 23 – 42 % – 1 группа и 28 – 55 %, Мср=36,2 % и 41,8 %. Процентная доза на RTVdvh на область молочной железы составила 90 – 98 % и 88 – 95 %, Мср=94,5 % и 90,1 %.

**Выводы.** Наилучшее распределение дозы на мишень и меньшее повреждающее воздействие на критические органы получено при использовании плавающей стыковки между верхним фигурным полем и тангенциальными полями.

*Е.А. Маслюкова, С.И. Заброда, Л.И. Корытова, К.М. Пожарисский, Г.А. Раскин, О.В. Корытов*

### **ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕРВОГО ТИПА (ALDH1) У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ)**

*ФГБУ «РНЦРХТ», Санкт-Петербург*

**Цель исследования.** Определение экспрессии ALDH1 в опухолевых клетках у больных РМЖ.

**Материалы и методы.** С целью изучения экспрессии ALDH1 проводилось иммуногистохимическое исследование 83 пациентки с РМЖ (T2-4N0-3M0). Антитело к ALDH1 использовалось фирмы Epitomics, было клональным моноклональным (клон EP1932Y), разведение 1:200. Оценка уровня ALDH1 осуществлялась путем подсчета числа позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток. Количество окрашенных клеток больше 1 % относилось к группе с высоким содержанием стволовых опухолевых клеток ALDH1 (high) – группа 1, меньше 1 % – с низким содержанием ALDH1 (low) – группа 2. В группу 1 вошли 16, в группу 2 – 67 пациенток. G1 и G2 опухоли чаще встречались в группе ALDH1(low), тогда как G3 в группе ALDH1(high),  $p=0,006$ .

**Результаты.** Не было отмечено каких-либо достоверных различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, категории T и индекса Ki-67 в отношении экспрессии ALDH1. У больных с высокой экспрессией ALDH1(high) время до прогрессирования и выживаемость были достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с ALDH1 (low).

**Выводы.** ALDH1 в клетках опухоли РМЖ – дополнительный прогностический маркер.

*А.А. Машалов, С.И. Ткачев*

### **ФОТОТЕРАПИЯ ПОСТЛУЧЕВЫХ РЕАКЦИЙ И ОСЛОЖНЕНИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ** *ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Лучевая терапия используется в лечении 20 – 80 % онкологических больных. Её проведение нередко сопровождается появлением ряда побочных патологических реакций и осложнений, негативно влияющих на её конечные результаты. С целью коррекции этих нарушений и защиты нормальных тканей используют лекарственные и нелекарственные средства (гипертермия, гипергликемия и т.д.), применение которых не всегда приносит ожидаемые результаты. При этом наибольшие трудности представляет лечение лучевой патологии внутренних органов. В этой связи в последние годы значительно возрос интерес к использованию лазерного и светодиодного излучений в лечении этой патологии.

**Цель исследования.** Разработка методических подходов к фототерапии лучевых повреждений внутренних органов глубокой локализации.

**Материалы и методы.** Радиомодифицирующее и протекторное действие лазерного излучения изучалось у онкологических больных, проходивших курс химиолучевой терапии (более 200 больных). Работа выполнена на терапевтических лазерных установках с излучением в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах длин волн (560 нм – 1264 нм).

**Результаты и выводы.** По результатам проведённого клинического исследования показана целесообразность такого воздействия. Положительный клинический эффект достигнут в 80 % случаев. Впервые показана эффективность лазерного воздействия на лучевую патологию глубоко расположенных органов и тканей (пищевод, лёгкое, средостение, мочевого пузыря, простата). Результаты наблюдения убедительно показывают эффективность использования фототерапии как радиомодификатора, улучшающего конечные результаты лечения онкологических больных.

*И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, Н.Ю. Кульбачевская,  
А.А. Кузнецова, В.А. Чалей, В.М. Бухман*

### **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ** **ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО МЕТОТРЕКСАТА И МЕТОТРЕКСАТА-ЭБЕВЕ**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Цель исследования.** Сравнительная патоморфологическая оценка внутренних органов крыс после 3-кратного ежедневного внутривенного применения метотрексата, воспроизведенного в РОНЦ (МТХ-В), и метотрексата фирмы Эбеве (МТХ-Эбеве).

**Материалы и методы.** Использование проведено на 70 неинбредных крысах-самцах. МТХ-В и МТХ-Эбеве вводили 3-кратно ежедневно внутривенно в суммарных дозах 0,6, 1,0 и 10 мг/кг. По 5 крыс из каждой группы усыпляли диэтиловым эфиром на 3-е и 30-е сутки после прекращения введения препаратов. На вскрытии были взяты участки внутренних органов – головного мозга, сердца, легких, печени, желудка, тонкого и толстого кишечника, почек, мочевого пузыря, селезенки, тимуса, костного мозга, надпочечников, поджелудочной железы, щитовидной железы, семенников. Взятый материал подвергали общепринятой гистологической обработке, включавшей фиксацию в 10 % формалине и окраску срезов гематоксилином и эозином. Микропрепараты анализировали в микроскопе при увеличении 100, 400, 1000.

**Результаты.** МТХ-В и МТХ-Эбеве в суммарных дозах 1,0 и 10 мг/кг на 3 сутки после окончания введения вызвали сходные по характеру и глубине морфологические изменения в ряде внутренних органов. Оба препарата МТХ-В и МТХ-Эбеве вызвали дозозависимую гипоплазию гемопоэтических клеток костного мозга, деструктивно-воспалительные изменения в тонком кишечнике, признаки торможения сперматогенеза в семенниках, а в дозе 10 мг/кг – выраженную гипоплазию лимфоцитов в тимусе. При применении МТХ-В МТХ-Эбеве в суммарной дозе 0,6 мг/кг не отмечено четких изменений во внутренних органах крыс как на 3-е, так и на 30-е сутки опыта. К 30-м суткам после окончания применения МТХ-В и МТХ-Эбеве в суммарной дозе 1,0 мг/кг отмеченные на 3-е сутки морфологические изменения были полностью обратимы в костном мозге и тонком кишечнике крыс. В семенниках отдельных крыс имели место морфологические признаки торможения сперматогенеза.

**Выводы.** МТХ-В и МТХ-Эбеве при 3-кратном внутривенном ежедневном введении крысам вызывают сходные дозозависимые морфологические изменения в тонком кишечнике, костном мозге, тимусе и семенниках и проявляют одинаковый характер обратимости этих изменений.

*А.В. Мешечкин, Л.И. Корытова, Н.Д. Олтаржевская., М.А. Коровина, О.В. Корыто, В.Г. Красникова*

### **РЕЗУЛЬТАТЫ РАДИОМОДИФИКАЦИИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ**

#### **У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ**

*ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург  
ООО «Колетекс», Москва*

**Цель исследования.** Оценить эффективность использования дисков на основе альгината натрия с 5-фторурацилом в ходе лучевой терапии (ЛТ).

**Материалы и методы.** В исследование включены 39 пациентов с диагнозом рак прямой кишки (РПК). Для радиомодификации использовали «Колегель-5-фтур-диск» интра ректально. В 1 группу были включены 19 пациентов, которым проводилась ЛТ на область малого таза до СОД 50 Гр с радиомодификацией таблетированным 5-фторурацилом. Во 2 группу включили 20 пациентов, которые получали ЛТ и системную химиотерапию.

**Результаты.** Во 2 группе тошнота 1 ст была отмечена у 3 пациентов, лучевой ректит 2 ст – у 12, лучевой эпителиит 2 ст – у 7. В 1 группе тошнота 1 ст наблюдалась у 4 пациентов, лучевой ректит 1–2 ст – у 13, лучевой эпителиит 2 ст – у 7. В результате лечения во 2 группе полный регресс (ПР) был достигнут у 1 пациента, частичный регресс (ЧР) – у 15, стабилизация – у 3, прогрессирование – у 1, т.е. клинический эффект – у 19 из 20 пациентов. В 1 группе ПР диагностирован у 3 пациентов, ЧР – у 16, т.е., у всех больных был получен клинический эффект.

**Выводы.** Применение материала гидрогелевого «Колегель-5-фтур-диск» в процессе ЛТ не увеличивает частоту лучевых реакций слизистой прямой кишки. Все пациенты получили запланированный курс ЛТ без перерыва. Отмечено повышение непосредственной эффективности ЛТ рака прямой кишки.

*О.В. Минаева, О.А. Куликов, Р.М. Евсеев, С.А. Фирстов, Н.А. Пятаев, А.В. Кокорев, А.В. Заборовский*  
**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ  
МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА**

*ФГБОУ ВПО «МГУ. Н.П. Огарева», Саранск*

**Цели исследования.** Модифицировать поверхность наночастиц оксида железа биосовместимым стабилизатором и полимерами. Оценить *in vitro* гемосовместимость и цитотоксичность модифицированных наночастиц.

**Материалы и методы.** Были синтезированы наночастицы оксида железа (НЧЖ) стабилизированные олеиновой кислотой (ОК) и лимонной кислотой (ЛК). Получены полимерные капсулы (ПК) из полиэлектролитов полистирилсульфоната (PSS) и полиаллиламина гидрохлорида (РАН), в состав которых были включены НЧЖ, стабилизированные ЛК. Цитотоксичность оценивалась по данным МТТ-теста на культуре клеток ВL-102. Гемосовместимость оценивалась микроскопически после инкубации с цельной кровью человека *in vitro*. Анализировались жизнеспособность и фагоцитарная активность лейкоцитов.

**Результаты и выводы.** Данные МТТ теста оказались неинформативными: оптическая плотность образцов с НЧЖ была в 2-3 раза выше, чем в контрольных лунках. Возможная причина – нестабильность МТТ в среде, содержащей НЧЖ, и его спонтанное окисление до формазана. Для уточнения применимости МТТ-теста необходимы дополнительные эксперименты по коинкубированию МТТ с НЧЖ и исследование прооксидантной активности всех типов синтезированных НЧЖ.

Характер взаимодействия НЧЖ с клетками крови зависел от типа применяемого стабилизатора. НЧЖ, стабилизированные олеиновой кислотой, уменьшали количество жизнеспособных лейкоцитов на 10 % ( $p=0,04$ ). При микроскопии мазков НЧЖ, стабилизированных ОК, были видны их скопления, располагавшиеся внеклеточно. НЧЖ, стабилизированные ЛК, и полимерные капсулы на их основе не влияли на жизнеспособность лейкоцитов крови. При микроскопии данные частицы визуализировались как внеклеточно, так и в цитоплазме нейтрофилов, что позволило сделать вывод о фагоцитозе НЧЖ, стабилизированных ЛК, и полимерных капсул на их основе. Активность фагоцитоза НЧЖ составила  $37\pm 7,1\%$ , капсул –  $44,7\pm 5,4\%$  соответственно, что достоверно ниже контрольных величин, полученных для дрожжей ( $93\pm 8,5\%$ ,  $p=0,002$ ).

*Работа выполнена в рамках Госзадания ФГБОУ ВПО "МГУ им. Н.П.Огарева". Код проекта 2952.*

*А.Ф. Миронов, М.А. Грин*

**АНТИМИКРОБНАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАТИОННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛОИМИДОВ ХЛОРОФИЛЛА *a*  
И БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *a***

*МИТХТ имени М.В. Ломоносова, Москва*

В настоящее время активно развивается метод фотодинамической антимикробной терапии, основанный на инактивации вирусов, бактерий, дрожжевых грибов и простейших активными формами кислорода, которые генерируются фотосенсибилизаторами в возбужденном состоянии. По отношению к антимикробной фотодинамической терапии (ФДТ) у патогенов не развивается устойчивости, бактерицидный эффект носит локальный характер и не имеет системного действия на нормальную флору организма. Это происходит потому, что ни фотосенсибилизатор, ни световое облучение в отдельности не обладают бактерицидным действием или другими повреждающими эффектами. Наиболее актуально использование антимикробной ФДТ для разрушения бактериальных биопленок, которые представляют собой организованные сообщества бактерий, интегрированные в экзополимерный матрикс.

В настоящей работе получены новые катионные циклические имиды в ряду хлорофилла *a* (Хл *a*) и бактериохлорофилла *a* (Бхл *a*) и изучена их антибактериальная активность. В качестве исходных соединений в синтезе целевых пигментов были использованы *N*-аминоциклоимиды, в экзоциклические аминогруппы которых были введены остатки никотиновой и изоникотиновой кислот с последующей кватернизацией атомов азота пиридиновых колец.

Проведенные исследования показали, что предлагаемые катионные фотосенсибилизаторы обладают высокой антибактериальной эффективностью против грамположительных *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa* бактерий в виде планктонных клеток и в составе биопленок. Впервые показана полная фотодинамическая инактивация особо устойчивых бактериальных биопленок *Pseudomonas aeruginosa* при использовании в качестве фотосенсибилизатора 1 мМ вводно-кремоформной мицеллярной дисперсии метилового эфира 13<sup>3</sup>-*N*-(*N*-метилникотинил)пурпуринимиды, времени инкубации 1 час и дозе облучения 105 Дж/см<sup>2</sup>. Исследования, проводимые при помощи микроскопии с использованием маркера «Live/Dead Biofilm Viability Kit», показали, что фотосенсибилизатор взаимодействуя с биопленкой, вызывает полную инактивацию бактерий.

Дополнительным преимуществом предлагаемых катионных фотосенсибилизаторов является то, что максимум их поглощения находится в области 706 нм для пурпуринимиды и 830 нм для бактериопурпуринимиды, где собственное поглощение биологических тканей невелико. Это позволит эффективно лечить очаги инфекции с глубокой инфильтрацией в ткани.

В.А. Мисюрин<sup>1</sup>, А.В. Мисюрин<sup>1,3</sup>, А.Е. Мисюрина<sup>2</sup>, Л.А. Кесаева<sup>1</sup>, Ю.П. Финашутина<sup>1</sup>,  
В.В. Тихонова<sup>1</sup>, А.А. Сальник<sup>1</sup>, Е.Н. Мисюрина<sup>3</sup>, И.Н. Солдатова<sup>3</sup>, А.А. Крутов<sup>3</sup>, А.Ю. Барышников<sup>1</sup>

### ТРАНСКРИПТ ГЕНА PRAME – НАДЕЖНЫЙ ИНДИКАТОР РИСКА РАЗВИТИЯ РАННЕГО РЕЦИДИВА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПРИМИЕЛОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>ФГБУ ГНЦ МЗ РФ, Москва

<sup>3</sup>КДЦ «ГеноТехнология», Москва

**Актуальность.** Ранее в нашей лаборатории было установлено ценное прогностическое значение уровня экспрессии раково-тестикулярного гена *PRAME* в костном мозге первичных больных острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ). В клинической практике для выявления группы риска у больных ОПЛ определяют мутации в гене *FLT3*. Точечные мутации в положении ASP853 с высокой вероятностью указывают на развитие раннего рецидива. По современным данным, эти мутации распространены приблизительно у 15 % первичных больных ОПЛ, однако ранние рецидивы развиваются приблизительно у половины представителей данной группы.

**Цель исследования.** Сравнить прогностическое значение ранее разработанной нами модели по определению уровня экспрессии гена *PRAME* с моделью оценки риска развития раннего рецидива по наличию мутаций в положении ASP853 гена *FLT3*.

**Материалы и методы.** Методом RQ-PCR в клетках костного мозга первичных больных ОПЛ был определён уровень экспрессии гена *PRAME*, а также изоформ *bcr1* и *bcr3* химерного гена *PML/RARα* относительно гена *ABL*, и наличие точечных мутаций в положении ASP853 гена *FLT3*. В исследованную группу было включено 92 больных, получивших лечение согласно протоколу AIDA. Медиана срока наблюдения динамики развития ранних рецидивов с момента начала терапии составила 23 мес. Для статистической обработки результатов были использованы критерии Манна-Уитни и  $\chi^2$ .

**Результаты.** Тип транскрипта *bcr1* гена *PML/RARα* был выявлен у 52 % (48/92) больных, тип *bcr3* – у 48 % (44/92). У 100 % больных (92/92) экспрессировался ген *PRAME*. Замены в положении были обнаружены у 14 % (13/92) больных. Все больных достигли полной ремиссии. За время наблюдения у 19 % (18/92) из них развился ранний рецидив. Мутации гена *FLT3* обнаружены у 39 % (7/18) первичных больных, имевших в последующем ранний рецидив ( $p=0,067$ ). У 100 % больных с ранним рецидивом при постановке диагноза наблюдался низкий уровень экспрессии гена *PRAME* по отношению к *PML/RARα* ( $p=0,008$ ), что согласуется с нашими предшествующими данными.

**Выводы.** Низкий уровень экспрессии гена *PRAME* относительно изоформ *bcr1* и *bcr3* химерного гена *PML/RARα* позволяет предсказать ранний рецидив с большей надёжностью, чем наличие мутаций положения ASP853 гена *FLT3*.

Г.Ф. Михайлова, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб, В.В. Цепенко, А.А. Невольских

### ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ГЕНА ZNF-217 МЕТОДОМ FISH У БОЛЬНЫХ РЕЗЕКТАБЕЛЬНЫМ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск

**Цель исследования.** Изучить молекулярно-генетические нарушения локуса 20q13 (ген *ZNF-217*) в группах больных раком прямой кишки с неблагоприятным и промежуточным прогнозом.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на архивном биопсийном материале 47 больных раком прямой кишки методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH). В работе была использована коммерческая ДНК-проба LSI ZNF217 (Vysis, США).

**Результаты.** 100 % больных имеют числовые нарушения гена *ZNF-217* в обеих группах; количество опухолевых клеток с нарушением частоты гена *ZNF-217* в группе неблагоприятного прогноза варьировалось в пределах 54 – 100 %, а в группе промежуточного прогноза 47 – 97 %; среднее число копий гена *ZNF-217* на клетку в группе неблагоприятного прогноза колебалось от 1,2 до 6,3, составляя в среднем по группе 4,4; в группе промежуточного прогноза вариабельность данного показателя была 2,3 – 7,3, составляя в среднем по группе 4,5.

**Выводы.** Таким образом, несмотря на выявленные числовые нарушения гена *ZNF-217* у 100 % больных резектабельным раком прямой кишки дифференцировать по генетическим нарушениям клинически сформированные группы промежуточного и неблагоприятного прогноза не удалось.

Н.А. Михеева<sup>1</sup>, Г.С. Терентюк<sup>1,2</sup>, Н.Г. Хлебцов<sup>3</sup>

### ПРОНИЦАЕМОСТЬ НЕКОТОРЫХ ГИСТОГЕМАТИЧЕСКИХ БАРЬЕРОВ ДЛЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ ПРИ ИХ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО УлГУ, Ульяновск

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Ульяновск

<sup>3</sup>ФГБУН ИБФРМ РАН, Ульяновск

**Актуальность.** Гистогематические барьеры (ГГБ) представляют собой структурно-функциональные механизмы, выполняющие регуляторную и защитную функции, что обеспечивает относительное постоянство физико-химических свойств, физиологической активности межклеточной среды органа в зависимости от его функционального состояния, а также защиту органов от поступления чужеродных или токсичных веществ эндо- и экзогенной природы. Наночастицы золота (ЗНЧ) получили широкое применение в фундаментальных и прикладных биомедицинских исследованиях, в диагностике, направленном транспорте лекарств и фототермической терапии опухолей. Однако, несмотря на это, вопрос о возможном проникновении наночастиц через ГГБ остается мало изученным.

**Задачи исследования.** Изучить проницаемость ГГБ белых крыс при внутривенном введении ЗНЧ.

**Материал и методы.** Самцам и беременным самкам белых крыс, в хвостовую вводили 0,7 мл суспензии 5-, 10, 30- и 50-нм ПЭГелированных ЗНЧ. Интактной группе животных вводили физиологический раствор. Наличие ЗНЧ в тканях выявляли методом аутометаллографии нитратом серебра, а общее содержание золота в тканях оценивали методом атомной адсорбционной спектроскопии (ААС). Исследовали проницаемость гематоплацентарного (ГПБ), гематоэнцефалического (ГЭБ), гематотестикулярного (ГТБ) и гематоретинального (ГРБ) барьеров.

**Результаты.** Установлена проницаемость ЗНЧ диаметром 5, 10, 30 и 50 нм через ГПБ хориального типа лабораторных белых крыс *in vivo*. Методом ААС установлено, что общее содержание ЗНЧ указанных диаметров в плодах экспериментальной группы в среднем достоверно превышает таковое плодов контрольной группы примерно в 8 раз (на уровне  $p < 0,005$ ). ЗНЧ присутствуют в печени и селезенке плодов. Применение метода аутометаллографии позволило установить факт проницаемости ЗНЧ диаметром 5 нм для ГЭБ – золото определяется в цитоплазме нейроцитов головного мозга самок крыс. ГТБ и ГРБ оказываются непроницаемыми для ЗНЧ всех указанных диаметров – ни ААС, ни применение метода аутометаллографии не позволило определить ЗНЧ в тканях органов.

**Выводы.** Продемонстрирована размерная зависимость проницаемости ГГБ для ЗНЧ при парентеральном введении.

Д.В. Мищенко<sup>1</sup>, М.Е. Негазова<sup>2</sup>, Е.Н. Климанова<sup>1</sup>, Т.Н. Саиенкова<sup>1</sup>, У.Ю. Аллаярова<sup>1</sup>, Е.Ф. Шевцова<sup>2</sup>, Н.П. Ковалова<sup>1</sup>, И.В. Выстороп<sup>1</sup>

### ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ IN VIVO В РЯДУ 1-ГИДРОКСИ-1,4,8-ТРИАЗАСПИРО[4.5]ДЕКАНОНОВ

<sup>1</sup>ИИХФ РАН, Черногловка

<sup>2</sup>ИФАВ РАН, Черногловка

**Актуальность.** В современной химиотерапии опухолей развивается направление по созданию таргетных препаратов. В качестве таких соединений могут выступать циклические гидроксамовые кислоты (ЦГК), являющихся потенциальными ингибиторами фермента гистондеацетилазы, который усиливает пролиферацию опухолевых клеток, ингибирует их апоптоз, содействует процессу метастазирования. Ранее на экспериментальных животных нами показан антилейкемический и антиметастатический эффект новых циклических гидроксамовых кислот (ЦГК).

**Цели исследования.** Определение противоопухолевой и хемосенсибилизирующей активности полученных рацемических ЦГК в ряду 1-гидрокси-1,4,8-триазаспиро[4.5]деканонов на экспериментальных лекарственно-чувствительных моделях, а также провести анализ взаимозависимости структура–противоопухолевая активность.

**Результаты и выводы.** Найдено, что ЦГК на основе DL-валина и DL-фенилаланина обеспечивают заметный уровень выживаемости (25 – 63 %) и увеличения средней продолжительности жизни (в 1,4 – 2 раза) экспериментальных животных при терапии лейкемии P388 в сочетании с циклофосфаном и цисплатином. Установлено, что увеличение конформационной энергии алкильного заместителя ( $\text{CHMe}_2 > \text{CH}_2\text{Ph} > \text{CH}_2\text{CHMe}_2 > \text{Me}$ ) имидазolidинового цикла соединений ряда 1-гидрокси-1,4,8-триазаспиро[4.5]декан-2-она способствует значительному повышению их адьювантной способности (усилению противоопухолевого действия цитостатиков) при терапии лейкемии P388. Исследовано влияние ЦГК на митохондриальные характеристики (mitochondrial permeability transition (MPT)). Установлено, что ЦГК, усиливающие  $\text{Ca}^{+2}$ -индуцируемое набухание митохондрий, способны потенцировать MPT, это может свидетельствовать о возможности про-апоптотического эффекта данных соединений.

При поддержке РФФИ (13-03-01142).

*Д.В. Мищенко<sup>1</sup>, М.Е. Неганова<sup>2</sup>, Е.Н. Климанова<sup>1</sup>, Т.Н. Саенкова<sup>1</sup>, У.Ю. Аллаяров<sup>1</sup>, Е.Ф. Шевцова<sup>2</sup>, М.В. Макаров<sup>3</sup>*

### **ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3,5-БИС(АРИЛИДЕН)-4-ПИПЕРИДИНОНОВ**

<sup>1</sup>ИПХФ РАН, Черноголовка

<sup>2</sup>ИФАВ РАН, Черноголовка

<sup>3</sup>ИНЭОС РАН, Москва

**Актуальность.** На сегодняшний день в клинической практике применяется ряд фосфорсодержащих лекарственных средств, в частности, противоопухолевые препараты циклофосфамид и фосфэстрол.

**Цели исследования.** Определение противоопухолевой и хемосенсибилизирующей активностей новых соединений из класса 3,5-бис(арилиден)-4-пиперидинонов с моно- (МАК-168) и бисфосфонатными (МАК-166) группировками.

**Материалы и методы.** Противоопухолевую активность определяли *in vivo* на моделях лейкоза Р388 и меланомы В16. Острую токсичность определяли *in vivo* при однократном введении водных растворов исследуемых соединений. Токсичность *in vitro* выявляли на культуре клеток нейронов коры головного мозга крыс методом МТТ.

**Результаты и выводы.** В экспериментах *in vivo* показано, что введение бисфосфонатного фрагмента в структуру 3,5-бис(арилиден)-4-пиперидинонов приводит к возрастанию токсичности соединений. Методом МТТ показано, что после 24ч инкубации культуры нейронов коры головного мозга крыс с концентрациями вещества МАК-166 выше 0,1 мкМ, наблюдалось значительное снижение выживаемости клеток, а при концентрации 0,01 мкМ выживаемость клеток оставалась на уровне контроля. Экспериментальные данные на моделях лейкоза Р388, а также меланомы В16 свидетельствуют об активности 3,5-бис(арилиден)-4-пиперидинонов в качестве хемосенсибилизаторов цисплатина и циклофосфана. При комбинации исследуемых соединений с противоопухолевыми цитостатиками, терапевтические дозы последних могут быть значительно уменьшены.

*Работа поддержана РФФИ (14-03-00687 А).*

*Д.В. Мищенко, Е.Н. Климанова, Т.Н. Саенкова, У.Ю. Аллаярова, Т.Н. Якущенко,*

*Н.П. Коновалова, И.К. Якущенко*

### **АНТИЛЕЙКЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРОДИМИНА**

*ИПХФ РАН, Черноголовка*

**Актуальность.** Продимин – это цитостатический препарат алкилирующего действия, в состав которого входят бромалкиламинные радикалы и обладает выраженной противолейкозной активностью, особенно сильно подавляет миелопролиферативные процессы. Применяют при хроническом миелолейкозе, эритремии, хроническом лимфолейкозе, а также при идиопатическом миелофиброзе и миелопролиферативном синдроме с тромбоцитозом. В ряде случаев эффективен при резистентности к другим противолейкозным препаратам.

**Цели исследования.** Определить острую токсичность и выявить антилейкемическую активность новых производных (Як-116 и Як-117) известного цитостатика продимина.

**Материалы и методы.** Методы определения токсичности и антилейкемической активности аналогично работе [Н.П. Коновалова, И.В. Выстороп и др., 2013]. В работе были использованы экспериментальные опухоли – лейкемия Р388, которую прививали внутрибрюшинно. При оценке антилейкемического эффекта учитывали число излеченных животных (проживших 60 суток) и индекс увеличения средней продолжительности жизни (ILS, %) леченых животных по сравнению с контрольными.

**Результаты и выводы.** Показано, что включение метильных групп по атомам азота не приводило к уменьшению токсического действия соединения ЯК-116 относительно продимина, а замена заместителя Br на Cl приводило к снижению токсичности вещества ЯК-117 в 1,5 раза.

Исследование противоопухолевой активности соединений ЯК-116 и ЯК-117 проводили на экспериментальной опухоли мышей лимфолейкозе Р388 в сравнении с таким известным противоопухолевым препаратом как продимин. Установлено, что терапия продимином увеличивала среднюю продолжительность жизни мышей на 43%, выживших мышей не было. В группе мышей, которым вводили раствор соединения ЯК-116 по истечении 60 суток наблюдения после трансплантации лимфолейкоза Р388, наблюдалось 33 % выживших животных и индекс увеличения средней продолжительности жизни (ILS, %) павших животных составил 110,6 %. В группе мышей, которым проводили терапию соединением ЯК-117 выживших животных не было, а индекс ILS, % не отличался от контрольной группы. Таким образом, ЯК-166 можно рекомендовать для дальнейших исследований как потенциальный противоопухолевый препарат.

*Д.В. Мищенко, Е.Н. Климанова, Т.Н. Сашенкова, У.Ю. Аллаярова, Н.П. Коновалова, И.И. Воронов, П.А. Трошин*  
**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОВАЛЕНТНЫХ КОНЬЮГАТОВ  
 ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C60 И РУБОКСИЛА**

*ИПХФ РАН, Черноголовка*

**Актуальность.** Использование наночастиц, в том числе фуллеренов, в медицине открывает новые возможности повышения эффективности терапии злокачественных новообразований. После того, как проблема растворимости производных фуллеренов в воде была успешно решена с помощью химической модификации, были синтезированы фуллереновые производные с различными функциональными группами, которые, с одной стороны, придают фуллереновым структурам растворимость, а с другой, позволяют модулировать у них различные виды биологической активности. Водорастворимые производные фуллерена C60 (ВПФ) за счет антиоксидантных свойств способны оказывать защитный эффект на нормальные ткани внутренних органов и могут быть полезны как потенциальные органопротекторы при противоопухолевой терапии.

**Цели исследования.** Изучение *in vivo* токсичности и противоопухолевой активности нековалентных конъюгатов производных фуллерена и противоопухолевого препарата рубоксила (Rbx).

**Материалы и методы.** Противоопухолевую активность определяли *in vivo* на моделях лейкоза P388. Лимфолейкоз P388 прививали внутрибрюшинно. При оценке антилейкемического эффекта учитывали число излеченных животных (проживших 60 суток) и индекс увеличения средней продолжительности жизни (ILS, %) леченых животных по сравнению с контрольными.

**Результаты и выводы.** Были исследованы следующие нековалентные конъюгаты фуллеренов с рубоксолом: VI-20, VI-30, VI-58 и VI-151. Установлено, что изученные ВПФ малотоксичны. Химиотерапия лейкоза мышей P388 нековалентными конъюгатами ВПФ с противоопухолевым препаратом Rbx приводило к увеличению количества выживших животных до 50% на 60 сутки наблюдения в случае введения соединений VI-138 и на 20-30% при лечении с использованием VI-58, VI-151 и VI-30. Также отмечается увеличение средней продолжительности жизни (ILS) экспериментальных животных до 385 % для VI-58 и от 292 до 329 % для соединений VI-58, VI-151 и VI-30.

*Г.Е. Морозевич, Н.И. Козлова, А.Е. Берман*

**ИНТЕГРИНЫ В МЕХАНИЗМЕ АНОИКИСА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*ИБМХ, Москва*

**Актуальность.** Рост и злокачественная прогрессия клеток опухолей во многом зависит от их взаимодействия с внеклеточным матриксом. Ключевыми участниками этого взаимодействия являются интегрины – рецепторы клеточной мембраны. Одним из распространенных и жизненно важным интегрином является коллаген-связывающий рецептор  $\alpha 2\beta 1$ .

**Цель исследования.** Выяснение роли интегрин  $\alpha 2\beta 1$  в приобретении раковыми клетками способности к блокированию субстрат-зависимого апоптоза (аноикиса), к их выживанию в отсутствие связи с матриксом, что создает условия для злокачественной прогрессии – инвазии раковых клеток в окружающие ткани и образованию метастазов.

**Материалы и методы.** В работе исследовалась линия клеток MCF-7 карциномы молочной железы человека. Методы: трансдукция клеток мшРНК, цитофлуориметрия, электрофорез в ПААГ, иммуноблоттинг. **Результаты.** Блокирование экспрессии интегрин  $\alpha 2\beta 1$  в линии MCF-7 карциномы молочной железы значительно увеличивает чувствительность клеток к субстрат-зависимому апоптозу (аноикису) и резко тормозит их способность к образованию клонов. Торможение экспрессии  $\alpha 2\beta 1$  сопровождается увеличением синтеза белков p53 (промотора апоптоза) и p27 (ингибитора циклин-зависимых протеинкиназ), с одной стороны, и уменьшением продукции антиапоптогенного белка Bcl2 и полифункционального белка cMyc, с другой. Снижение в клетках  $\alpha 2\beta 1$  не влияет на активность протеинкиназы Akt, но резко усиливает активность киназы Erk1/2. Торможение последней не влияет на аноикис контрольных клеток, однако снижает до их уровня аноикис клеток с заблокированным  $\alpha 2\beta 1$ .

**Вывод.** Впервые показано, что интегрин  $\alpha 2\beta 1$  участвует в защите клеток карциномы молочной железы через ингибирование сигнальной протеинкиназы Erk.

*Н.Б. Морозова<sup>1</sup>, Е.А. Плотникова<sup>1</sup>, Е.Н. Шевченко<sup>2</sup>, Л.И. Соловьева<sup>2</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>2</sup>, Р.И. Якубовская<sup>1</sup>*

**ПОИСК НОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ  
 ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ**

*<sup>1</sup>ФГБУ «ФМИЦ им. П.А.Герцена» МЗ РФ, Москва*

*<sup>2</sup>ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва*

**Цель исследования.** Поиск новых фотосенсибилизаторов (ФС) фталоцианинового ряда, предназначенных для флуоресцентной диагностики злокачественных новообразований.

**Задачи исследования.** Оценка флуоресцентной контрастности (ФК) новых производных фталоцианина у мышей – опухоленосителей.

**Материалы и методы.** Исследовали производные октакарбокситфалоцианина цинка:  $ZnPc(COONa)_8$  (1),  $ZnPc(CON(CH_2)_4NCH_3)_8$  (2),  $ZnPc[CON(CH_2)_4N(CH_3)_2^+OSO_2PyCH_3^-]_8$  (3) и безметалльный –  $H_2Pc(COONa)_8$  (4) в дозе 0,5 мг/кг у мышей BDF<sub>1</sub>, самок с привитой саркомой S37 подкожно на бедро. ФК между опухолью, лимфоузлами и окружающей тканью оценивали методом локальной флуоресцентной спектроскопии

**Результаты.** Показано, что наиболее высокая флуоресценция в первичной опухоли и лимфоузлах выявлена для ФС (1) и (2). Для этих же соединений (через 24 часа после внутривенного введения) в опухолевом узле зарегистрирована максимальная ФК, составляющая 3,8 и 4,9 усл.ед. относительно кожи и 3,3 и 3,5 усл.ед. относительно мышцы, соответственно. Величина ФК в паховом лимфоузле, пораженном метастазами, также оказалась высокой и составляла 3,8 и 4,5 усл.ед. относительно кожи, 3,3 и 3,5 усл.ед. – относительно мышцы.

**Выводы.** Выявлены перспективные красители ( $ZnPc(COONa)_8$ ,  $ZnPc(CON(CH_2)_4NCH_3)_8$ ) для дальнейшего изучения в качестве агентов для ФД первичных и метастатических очагов злокачественных новообразований.

Н.А. Наволокин, Н.В. Полуконова, Д.А. Мудрак, С.А. Тычина, Н.В. Корчаков,  
М.О. Воронков, А.Б. Бучарская, Г.Н. Маслякова

### СРАВНЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО И ВХОДЯЩЕГО В ЕГО СОСТАВ КВЕРЦЕТИНА ПРИ ИНТРОТУМОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

ГБОУ ВПО СГМУ им. В.И. Разумовского, Саратов

**Актуальность.** Ранее нами было установлено, что в состав экстракта аврана лекарственного, наряду с другими флавоноидами, входит кверцетин.

**Цель исследования.** Сравнить противоопухолевую активность флавоноидсодержащего отдельно экстракта аврана лекарственного и отдельно кверцетина в эксперименте *in vivo* на белых крысах с перевитым раком РС-1 при интротуморальном введении.

**Материалы и методы.** Сырье собрано на территории Саратовской обл., экстракт аврана получен авторским способом (Патент РФ №2482863). Дизайн эксперимента: животные с перевитым раком печени РС-1 были разделены на 3 группы. Первая – группа сравнения с опухолью без воздействия. Вторая и третья группы – экспериментальные с многократным интротуморальным введением аврана (доза 37 мг/мл) и кверцетина (доза 0,25 мг/мл с учетом его содержания в авране) в течение 3 недель после достижения опухолями размера 1 см<sup>3</sup>. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации, забирали опухоль гистологического исследования.

**Результаты.** При введении экстракта аврана отмечали уменьшение размеров опухоли и появление в ней обширных полостей, заполненных жидкостью, при гистологическом исследовании наблюдали некроз опухоли и выраженную соединительно-тканную капсулу вокруг нее. При введении кверцетина не отмечали уменьшения размеров опухоли в отличие от группы сравнения, макроскопически опухоль была также сходна с группой сравнения, не наблюдали морфологических признаков повреждения.

**Выводы.** Таким образом, выраженный цитотоксический эффект аврана обусловлен не присутствием в его составе кверцетина, так как последний не обладает противоопухолевым эффектом.

Ж.К. Назаркина<sup>1,3</sup>, М.В. Харьковца<sup>1</sup>, Д.В. Антоненко<sup>2</sup>, С.И. Бажан<sup>2</sup>,  
Л.И. Карпенко<sup>2</sup>, А.А. Ильичев<sup>1,2</sup>, П.П. Лактионов<sup>1,3</sup>

### КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ КАНДИДАТНОЙ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>ИХБФМ СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>ГНЦВБ «Вектор», р.п. Кольцово

<sup>3</sup>НИИПК имени ак. Мещалкина, Новосибирск

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место среди онкологических заболеваний женщин. Одним из вариантов селективного уничтожения опухолевых клеток, является использование противораковых ДНК-вакцин. С использованием программ TEpredict и PolyCTLDesigner сконструирована полиэпитопная ДНК ВС2, содержащая эпитопы белков HER2 и Mammaglobin-1 (Mam) – характерных онкогенов РМЖ. Получены апиригенные препараты плазмидных ДНК, кодирующие полиэпитопный антиген и полные копии HER2 и Mam. Зрелые дендритные клетки (ДК) были получены дифференцировкой из моноцитов периферической крови человека. Показано, что полученные ДК обладают морфологическими и фенотипическими признаками зрелых ДК. Стимуляция ДК, трансфицированными плазмидными ДНК, приводит к усилению пролиферации Т-клеток и повышению секреции ИФН- $\gamma$  Т-клетками. Показано, что полученные ДК стимулируют Th1-поляризацию Т-клеток и индукцию цитотоксического иммунного ответа. Показана антиген-специфическая активация Т-клеток в ответ на стимуляцию ДК, трансфицированными рВС2. Полученные данные свидетельствуют об эффективности полиэпитопной ДНК-вакцины по сравнению с ДНК-вакцинами кодирующими полные копии антигенов

### М.Е. Неганова<sup>1</sup>, П.А. Тараканов<sup>1</sup>, Е.Ф. Шевцова<sup>1</sup>, И.В. Выстороп<sup>2</sup>, Д.В. Мищенко<sup>2</sup> ЖЕЛЕЗОХЕЛАТИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СПИРОЦИКЛИЧЕСКИХ ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ

<sup>1</sup>ИФВ РАН, Черногловка

<sup>2</sup>ИПХФ РАН, Черногловка

**Актуальность.** Известно, что гистоновые деацетилазы (HDAC) вовлечены в неопластический процесс. HDAC в своей структуре содержит металл  $Zn^{2+}$ . Однако Stephanie L. Gantt и др. показали, что в качестве металлокофактора для HDAC может выступать  $Fe^{2+}$ . Следовательно, одним из способов регулирования активности HDAC и, в целом, канцерогенеза может являться изменение концентрации ионов железа и окислительно-восстановительного статуса клетки.

**Цель работы.** Оценка  $Fe^{2+}$ -хелатирующей способности спироциклических гидроксамовых кислот.

**Результаты.** Методом, основанным на конкуренции хелатирования железа между феррозином и исследуемыми соединениями было установлено, что все соединения в рабочей концентрации  $10^{-4}$  М проявили  $Fe^{2+}$ -хелатирующую активность. При этом соединения, содержащие 2,2,6,6-тетраметилпиперидиновый цикл, оказались наиболее активными хелаторами, что подтверждается квантово-химическими расчетами.

**Заключение.** Таким образом, изученные спироциклические гидроксамовые кислоты могут выступать в качестве основы для создания фармакологических агентов для противоопухолевой терапии с  $Fe^{2+}$ -хелатирующим механизмом действия.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (13-03-01142).



Д.Л. Николаева<sup>1</sup>, А.В. Ланцова<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, А.П. Полозкова<sup>1</sup>, О.Л. Орлова<sup>1</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1,3</sup>, А.О. Райков<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>1</sup>, В.В. Мусияк<sup>2</sup>, Г.Л. Левит<sup>2</sup>, В.П. Краснов<sup>2</sup>, Н.Д. Бунятян<sup>3</sup>

### СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НОВОГО ПРЕПАРАТА ИЗ КЛАССА АЛКИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

<sup>3</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

**Актуальность.** Производные алкилнитрозомочевины (АНМ) – перспективная группа химических соединений, обладающих алкилирующим и карбамоилирующим действием в отношении опухолевых клеток. В связи с этим является актуальной разработка новых и совершенствование старых противоопухолевых препаратов данного класса. С этой целью в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского синтезировано новое соединение из класса АНМ – ормустин.

**Цель исследования.** Усовершенствование разработанной липосомальной лекарственной формы ормустина для повышения терапевтического эффекта и эффективности включения действующего вещества.

**Материалы и методы.** При определении оптимального состава липосомальной формы ормустина в качестве вспомогательных веществ использовали яичный лецитин, холестерин, PEG-2000 DSPE, 0,1% и 1% лимонную и 0,1 М соляную кислоты, цитратный буферный раствор с рН=4 и рН=5. Липосомы получали упариванием хлороформного раствора липидных компонентов до образования полупрозрачной липидной пленки. Пленку гидратировали водным раствором ормустина. Малые однослойные липосомы получали методом экструзии, последовательно пропуская липосомы через мембранные фильтры с уменьшающимся размером пор 0,45 и 0,22 мкм на экструдере Lipex™ Thermobarrel Extruder. Эффективность включения определяли пропусканием липосомальной дисперсии через хроматографическую колонку, заполненную сефадексом G-50 с последующим определением содержания ормустина на спектрофотометре Cary 100.

**Результаты и выводы.** В результате проведенных исследований установили, что использование цитратного буфера позволило получить липосомы с наибольшей эффективностью включения, но из-за нестабильности действующего вещества в данном составе в дальнейших исследованиях цитратный буфер не применялся. Введение соляной кислоты привело к значительному повышению растворимости, но низкое значение рН липосомальной дисперсии вызывало окисление липидов. Использование лимонной кислоты (0,1%) позволило не только повысить растворимость, но и получить стабильную при хранении при температуре +5 °С в течение двух недель лекарственную форму с эффективностью включения 60±5%.

Д.Л. Николаева<sup>1</sup>, А.В. Ланцова<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, А.П. Полозкова<sup>1</sup>, О.Л. Орлова<sup>1</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1,3</sup>, В.В. Мусияк<sup>2</sup>, Г.Л. Левит<sup>2</sup>, В.П. Краснов<sup>2</sup>, Н.Д. Бунятян<sup>3</sup>

### ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОМ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ОРМУСТИНА В РАСТВОРЕ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

<sup>3</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

**Актуальность.** Ормустин – новое соединение из класса алкилнитрозомочевины (АНМ), синтезированное в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН. Ормустин умеренно растворим в воде, мало растворим в 95% спирте, практически не растворим в органических растворителях. Для повышения растворимости ормустина с целью создания инъекционной лекарственной формы (ЛФ) применяли различные физико-химические методы, а также ряд технологических приемов.

**Цель исследования.** Изучения влияния различных технологических приемов на стабильность ормустина с целью увеличения скорости растворения и масштабирования процесса производства.

**Материалы и методы.** Субстанция ормустина и вспомогательные вещества, разрешенные для применения в составе инъекционных ЛФ (Kollidon 17 PF, Kollidon 12 PF, Kollisolv PEG-400, маннит, лимонная и 0,1 М хлоридоводородные кислоты и др.). Для ускорения процесса растворения применяли ряд технологических приемов: нагревание раствора до 60 °С, использование пропеллерной и магнитной мешалок, применение УЗ, разный порядок введения ингредиентов и др. Контроль за стабильностью ормустина в растворе осуществляли измерением количественного содержания и контролем рН.

**Результаты и выводы.** При проведении эксперимента стало очевидно, что нагревание в процессе растворения субстанции приводит к разрушению активного вещества (снижение концентрации на 18 – 20 %). Применение магнитной и пропеллерной мешалок практически не влияло на содержание ормустина, но при этом не наблюдалось существенного роста скорости растворения. С другой стороны, применение ультразвука в течение 20 – 30 мин не только повысило растворимость, тем самым существенно сократив время растворения, но и практически не повлияло на содержание ормустина в растворе. На основании всех проведенных исследований можно сделать заключение, что наиболее приемлема для получения раствора ормустина технология УЗ-измельчения, которая и применялась в дальнейших исследованиях.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

*Д.Л. Николаева<sup>1</sup>, А.В. Ланцова<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, А.П. Полозкова<sup>1</sup>, О.Л. Орлова<sup>1</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1,3</sup>, В.В. Мусияк<sup>2</sup>, Г.Л. Левит<sup>1</sup>, В.П. Краснов<sup>1</sup>, Н.Д. Бунятян<sup>1</sup>*

### **ПАРЕНТЕРАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА НОВОГО СОЕДИНЕНИЯ ИЗ КЛАССА АЛКИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ**

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

<sup>3</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

**Актуальность.** Основными методами лечения рака до сих пор являются применение хирургических операций и прием противоопухолевых лекарственных препаратов. Поэтому постоянно ведется поиск оригинальных лекарственных средств, который базируется на проведении химических, физических, биологических, фармацевтических и клинических исследований. С этой целью в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского синтезировано новое соединение из класса алкилнитрозомочевины – ормустин.

**Задача исследования.** Разработка стабильной и эффективной сублимационно высушенной парентеральной лекарственной формы (ЛФ) ормустина.

**Материалы и методы.** Субстанция ормустина, Kollidon 17 PF, Kollidon 12 PF, Kollisolv PEG-400, маннит, соляная и лимонные кислоты и др. вспомогательные вещества (ВВ), разрешенные для применения в составе парентеральных ЛФ. Стабильность разработанной ЛФ определяли исследованием влияния различных ВВ и технологических приемов (нагревание, применение УЗ, перемешивание на магнитной и пропеллерной мешалках, фильтрование и др.) на содержание действующего вещества. Количественное определение проводили на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия) при длине волны 228±2 нм.

**Результаты и выводы.** В ходе исследования физико-химических свойств субстанции ормустина оказалось, что данное соединение гидролитически неустойчиво, поэтому после изучения ряда способов стабилизации в качестве основных компонентов ЛФ были выбраны раствор 0,1 М хлористоводородной кислоты (в качестве растворителя) и Kollidon 17 PF (в качестве формообразователя для процесса лиофилизации). Полученная таким образом лиофилированная ЛФ оказалась стабильной при хранении при температуре – 18 °С в течение 6 мес по изученным параметрам (внешний вид, pH, концентрация действующего вещества), срок годности данной ЛФ исследуется.

*Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».*

*Д.Н. Николаевич*

### **ТЕСТ-СИСТЕМА НОВОГО УРОВНЯ, ПОЗВОЛЯЮЩАЯ РЕГУЛИРОВАТЬ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛОНОГЕННЫХ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕРЕЗ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

**Актуальность.** Одним из подходов к разработке способов регуляции пролиферации опухолевых клоногенных клеток является изучение механизмов опосредованной передачи сигналов через глутаматергическую систему. Глутаматные рецепторы имеют высокую плотность в опухолях головного мозга, где среди первичных опухолей – 60 % являются злокачественными.

**Цель исследования.** Разработка тест-системы нового уровня, которая позволит разделить популяцию опухолевых клеток на потомство клоногенных клеток методом клонирования *in vitro* и изучить характер и направленность процессов пролиферации клоногенных клеток с использованием лигандов глутаматных рецепторов.

**Материалы и методы.** Опыты проведены на экспериментальной модели мультиформной глиобластомы человека (клеточная линия глиомы крысы С6). В качестве агонистов глутаматных рецепторов (ГР) использовали: L-глутаминовую кислоту в дозах 10 мкМ, 100 мкМ, 1000 мкМ, 20 мМ, 200 мМ; NMDA (N-метил-D-аспартат) в дозах 1 мМ, 10 мМ, 100 мМ; AMPA ( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксанолпропионовую кислоту) – 0,5 мМ, 5 мМ; КА (каиновую кислоту) – 1 мМ, 10 мМ и ингибитор пролиферации – темозоломид (Темобел, РУП «Белмедпрепараты», РБ) в дозах 0,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл.

**Результаты.** Впервые установлено, что агонисты ГР являются факторами, изменяющими пролиферацию клоногенных опухолевых клеток, а также оказывают дозозависимое и избирательное действие на эти клетки: L-глутаминовая кислота в дозе 200 мМ, NMDA – 100 мМ и КА – 10 мМ на 50-70% подавляют пролиферацию клоногенных опухолевых клеток в клонах *in vitro*. В условиях сочетанного действия L-глутаминовой кислоты в дозе 10 мкМ и темозоломида в дозе 100 мкг/мл наблюдается достоверное снижение пролиферации клоногенных опухолевых клеток ниже контрольного уровня. Темозоломид в дозах 50 мкг/мл и ниже (дозы 0,5 и 5 мкг/мл) достоверно снижает эффективность клонирования клоногенных клеток в клонах *in vitro* по сравнению с контролем.

**Выводы.** Таким образом, действие темозоломида на клоногенные опухолевые клетки усиливается после изменения функционального состояния глутаматных рецепторов.

*Д.С. Новикова, А.В. Гарабаджю, В.Г. Трибулович*

### **РАЗРАБОТКА АКТИВАТОРОВ АМФК ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

*СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург, Россия*

**Актуальность.** Считается, что одной из причин возникновения раковых заболеваний является нарушение энергетического баланса на клеточном уровне. В связи с этим особый интерес представляет воздействие на АМФК (АМФ-активируемую протеин киназу) как на главный энергетический регулятор на клеточном уровне и на уровне организма в целом. Было показано, что использование АМФК в качестве мишени позволяет обеспечить онкосупрессорный эффект как минимум в трех направлениях: остановка клеточного цикла, связанная со стабилизацией p53 и ингибиторов циклин-зависимых киназ p21 и p27; подавление эффекта Варбурга через угнетение HIF-1 $\alpha$ ; ингибирование mTOR и белкового синтеза. Эффективность активаторов АМФК в борьбе с раковыми заболеваниями была продемонстрирована на таких известных препаратах, как метформин и AICAR, что делает подобные вещества потенциальными лекарственными препаратами. Существующие подходы к активации АМФК включают в себя поиск и создание АМФ-аналогов, к которым относится AICAR, разработку активаторов, действующих по альтернативным аллостерическим сайтам, а также выявление веществ, стимулирующих активирующие АМФК киназы (по данному механизму действует метформин). Однако наиболее перспективным подходом является блокирование действия автоингибиторного домена АМФК, функция которого заключается в связывании киназного домена и инактивации киназного комплекса.

**Материалы и методы.** С помощью виртуального скрининга диверсифицированной библиотеки химических соединений было идентифицировано соединение-хит, обладающее структурным сходством (коэффициент Танимото 0,85) с наиболее активным из известных на сегодняшний день блокаторов автоингибиторного домена (в литературе обозначается как Compound 24), но существенно отличающееся от последнего по строению. Активность выявленного соединения-хита была подтверждена на клеточной модели активации АМФК. Полученное соединение было положено в основу серии химических соединений, активирующих АМФК.

**Результаты и выводы.** Разработанная серия химических соединений на основе выявленного соединения-хита была синтезирована и исследована на способность активировать АМФК в клеточных условиях. По данным биологических экспериментов активность полученных соединений в среднем в 2 – 3 раза выше по сравнению с AICAR.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-03-31592 мол\_а) и Правительства РФ (грант 11.G34.31.0069 от 21.10.2011).*

*М.В. Оборотова, О.С. Бутова, М.А. Барышников, Т.Н. Заботина, К.А. Барышников, И.Н. Михайлова, Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Барышников*

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Задачи исследования.** Изучить и охарактеризовать экспрессию антигенов CD133, CD117, CD34, CD90, CD44, CD24, ассоциированных со стволовыми опухолевыми клетками (СОК), на клеточных линиях меланомы человека.

**Материалы и методы.** Клеточные линии меланомы человека mel Mtp, mel MtpX, mel Z, mel Kor, Malme-M3, mel Ibr, mel P, mel Cher, mel Is, mel Me, mel H, mel Hn, mel BGF, mel Si, mel Rac, mel Gus, mel Gi, mel Ksen, mel Ch, mel II, mel R из коллекции лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДИТО ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина». Реакция иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к антигенам CD133/2, CD117, CD34, CD90, CD24, CD44. Экспрессию антигенов оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II.

**Результаты.** Линии клеток различались по экспрессии антигенов, ассоциированных с СОК. Экспрессия исследуемых антигенов была гетерогенна. Экспрессия CD133 и CD117 наблюдалась на 6 (28,5 %) из 21 линии, CD90 – на 12 (57 %), CD 34 – на 4 (19 %), CD44 – на 17 (81 %) и CD 24 – на 5 (23,8 %) из 21 линии. На других линиях клеток экспрессия этих антигенов была менее 10 % (от 1 до 8,5 %). Клетки линии mel Ibr с уровнем экспрессии антигена CD133 8,5 % клонировали в полужидком агаре для выделения популяции, экспрессирующей CD133. Полученный клон, названный mel Ibr RMCR, имел 100 % CD133-положительных клеток. Таким образом, опухолевые клетки, экспрессирующие небольшой процент СОК-ассоциированных антигенов, являются СОК, а остальные клетки – их потомками. Наиболее часто на клеточных линиях встречался антиген CD44 – на 18 (85,7 %) из 21 клеточной линии.

**Заключение.** Клеточные линии, полученные из метастатической меланомы кожи человека, экспрессируют маркеры стволовых опухолевых клеток, экспрессия гетерогенна и колеблется от 1 % до 100 %. Из клеточной линии, представленной низким процентом антиген-позитивных клеток, можно выделить клон со 100 % экспрессией антигена СОК.

*М.С. Ольшанский, А.Н. Редькин, Н.А. Знаткова, С.А. Стикина, О.Л. Тищенко, Е.Д. Панов*

### **ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНЫЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА В ХИМИОЛУЧЕВОМ ЛЕЧЕНИИ РАКА РОТОГЛОТКИ**

*БУЗ ВО ВОКОД, Воронеж*

**Цель исследования.** Анализ одногодичных результатов применения внутриартериальной химиотерапии (ВАХТ) и химиоэмболизации (ХЭ) опухолевых сосудов в химиолучевой терапии (ХЛТ) рака ротоглотки.

**Материалы и методы.** С 2013 по 2014гг. ВАХТ с лучевой терапией (ЛТ) получили 24 пациента III и IV стадиями T<sub>2-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> рака ротоглотки. Плоскоклеточный рак верифицирован в 100 % случаев. ВАХТ проводили цисплатином (75 мг/м<sup>2</sup>) и 5-фторурацилом (750 мг/м<sup>2</sup>) в течение 45 минут в ветви обеих наружных сонных артерий. У 17 больных также выполнялась ХЭ. Через 24 часа после ВАХТ начинали ЛТ (2 Гр×5 дней в неделю до СОД70Гр). Кратность курсов ВАХТ составляла 21 день.

**Результаты.** Один курс ВАХТ получили 4 пациента (1 ХЭ) – 100% положительная динамика. Два курса ВАХТ 8 пациентов (7 ХЭ) – 100% положительная динамика, из них у 5 регресс опухоли более 60 %. Три курса ВАХТ у 8 пациентов, из которых: 2 больных (T<sub>4</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub>) умерли через 1 год, а у 6 (4 ХЭ) отмечен регресс опухоли более 60 %. Четыре курса ВАХТ и ХЭ получили 3 пациента – 100% положительная динамика. Двух больных прооперировали. Перед операцией выполнена ХЭ. У 7 больных ВАХТ проведена в связи с продолженным ростом опухоли после уже завершенной ХЛТ. Из них 1 пациенту проведено 7 курсов – прожил 18 месяцев, у 6 больных после стабилизации начата повторная ЛТ (все живы). Токсических реакций 3 – 4 степени не наблюдалось.

**Выводы.** Предоперационные ВАХТ и ХЭ создают благоприятные условия для последующего хирургического лечения. ВАХТ может рассматриваться, как метод выбора в случае продолженного роста опухоли после завершения ХЛТ.

*И.М. Омарова, В.Б. Сирота, Н.А. Кабилдина, Л.Е. Муравлева, О.А. Пономарева*

### **ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*КГМУ, Караганда, Казахстан*

**Цель исследования.** Изучение степени токсичности неоадьювантной химиотерапии (ХТ) у больных раком молочной железы.

**Материалы и методы.** В исследование включены 76 больных раком молочной железы (T<sub>2</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub>) в возрасте от 28 до 75 лет. В контрольной группе 30 больным проводили 4 курса неоадьювантной ХТ по схеме АС (доксорубин 50 мг/м<sup>2</sup>, циклофосфан 500 мг/м<sup>2</sup>), исследуемая группа 1 (26 человек) получала режим ХТ АС в сочетании с арглабином (арглабин 370 мг/м<sup>2</sup> № 7 дней), исследуемая группа 2 (20 больных) – монотерапию арглабином. Оценка гематологической токсичности проводилась согласно рекомендациям ВОЗ (Geneva, 1979, 1985).

**Результаты.** В контрольной группе нейтропения у 23,2±4,2 %, в исследуемой группе 1 – у 10,6±2,9 %, в исследуемой группы 2 – у 1,9±1,6 %. Наиболее выраженная анемия выявлена в контрольной группе 37,4±4,7 %, тромбоцитопения – в исследуемой группе 2 16,4±4,7 %. Тошнота и рвота одинаково часто в контрольной группе и исследуемой группе 1 19,8±3,9 %. Гепатотоксичность в контрольной группе в 11,1±3,2 %.

**Выводы.** Наиболее выраженная гематологическая и негематологическая токсичностью при проведении стандартной химиотерапии. Арглабин нивелирует токсическое действие стандартной полихимиотерапии.

*Д.Д. Орлова, А.В. Гарабаджу, В.Г. Трибулович*

### **ОПТИМИЗАЦИЯ ВНОВЬ СОЗДАННЫХ ТАРГЕТНЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

*СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург*

**Актуальность.** Подавление функции E3-лигазы Mdm2 и предотвращение протеолиза p53, приводящего к селективному апоптозу раковых клеток, является перспективной стратегией разработки противораковых лекарств – ингибиторов взаимодействия Mdm2-p53. На настоящий момент на первой фазе клинических испытаний находится несколько препаратов: RO5045337, RO5503781, MK-8242 (SCH 900242) и несколько других соединений. В их основе лежит имидазольный скаффолд с хлорзамещенными функциональными группами.

**Цель и задачи исследования.** На основе выявленного первичного круга ингибиторов, оптимизированного и испытанного in vivo, провести модификацию соединений в рамках решения таких задач, как повышение биодоступности, увеличение стабильности и активности. Выявить дополнительную мишень или определить побочное действие ингибиторов исследуемого класса.

**Материалы и методы.** На основании отобранных молекулярным докингом соединений с оксиндольным скаффолдом, обладающих заявленной активностью, синтезированных и проверенных на биологической модели (клеточная линия U2OSplv1, направленная на p53-опосредованный апоптоз), разработана схема их модификации, отвечающая задачам исследования. Выбрано направление модификации, позволяющее не только улучшить характеристики соединений, но и провести работу по определению побочного действия / дополнительной мишени ингибиторов.

**Результаты и выводы.** Произведена модификация ряда активных соединений, повышена их устойчивость к расщеплению, введены гидрофильные функциональные группы, позволяющие повысить водорастворимость, вместе с этим повышена расчетная активность ингибиторов. Подобран метод, позволяющий выявить дополнительные мишени или побочные эффекты. Метод основан на аффинной хроматографии и позволяет выявить дополнительные белки-мишени, связывающиеся с соединениями исследуемого ряда.

*А.А. Осипова, А.А. Борунова, Т.Н. Заботина, З.С. Смирнова, Н.М. Перетолчина,  
М.А. Барышников, А.Ю. Барышников*

### ЭКСПРЕССИЯ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА В КЛЕТКАХ МЫШИНОГО ЛЕЙКОЗА L1210

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н. Н. Блохина», Москва*

**Задачи исследования.** Определить статус гена *MDR-1* в трех штаммах мышинового лейкоза L1210: дикий штамм, устойчивый к лизомустину и устойчивый к аранозе.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на 3 штаммах мышинового лейкоза L1210: дикий штамм (чувствительный препаратам нитрозомочевины), устойчивый к лизомустину, устойчивый к аранозе. Клеточные линии получили из асцитных форм L1210 и культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС. В качестве контроля использовали клеточную линию диссеминированной меланомы человека *mel Kog*. Наличие Р-гликопротеина, кодируемого геном *MDR1*, определяли по выбросу родамина 123 из клеток. К  $5 \times 10^5$  клеток в объеме 50 мкл добавляли по 1 мл безсывороточной среды RPMI-1640 и по 3 мкл родамина 123. Клетки инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки центрифугировали в тех же условиях и двукратно отмывали раствором PBS. Клетки делили на две части и помещали в новые пробирки по 50 мкл в растворе PBS. В первую пробирку добавляли 1 мл полной среды роста, а во вторую – 2 мкл раствора винкристина и 1 мл полной среды роста и инкубировали их в течение 30 мин при 37 °С. После двукратной отмывки PBS клетки ресуспендировали в 300 мкл PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (Becton Dickinson, США) при длине волны 488 нм.

**Результаты.** Ранее в опытах *in vivo* было показано, что дикий штамм L1210 был чувствителен к цитотоксическому действию лизомустина и аранозы, устойчивый к аранозе был устойчив к аранозе, а устойчивый к лизомустину – к лизомустину. Исследование выброса родамина из клеток показало, что все три штамма линии L1210 накапливали Rh123 и выбрасывали его. Средние каналы флуоресценции (Mean) с блокатором Р-гликопротеина винкристином и без него равны соответственно 355,15 и 13,3 (дикий штамм), 246,3 и 47,8 (устойчивый к лизомустину), 187,4 и 13,3 (устойчивый к аранозе). Клеточная линия *mel Kog* (контроль) накапливала родамин 123, но не выбрасывала его. Средние каналы флуоресценции (Mean) с винкристином и без него равны соответственно 245 и 234.

**Заключение.** В результате проделанной работы можно сделать вывод о том, что все три исследованных штамма L1210 имеют гиперэкспрессию гена множественной лекарственной устойчивости, проявляющейся в накоплении и выбросе родамина 123. Устойчивость к аранозе и лизомустину не связана с гиперэкспрессией *MDR1* гена.

*Л.А. Островская<sup>1</sup>, А.Ф. Ванин<sup>2</sup>, Д.Б. Корман<sup>1</sup>, В.Д. Микоян<sup>2</sup>, Л.Н. Кубрина<sup>2</sup>, Р.Р. Бородулин<sup>2</sup>, М.М. Фомина<sup>1</sup>,  
Н.В. Блюхтерова<sup>1</sup>, В.А. Рыкова<sup>1</sup>*

### ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА – ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

<sup>1</sup>ФГУП Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>2</sup>ФГУП Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва

**Актуальность.** Известно, что динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами (глутатионом или цистеином) способны оказывать в физиологических условиях как позитивное, регуляторное, так и негативное влияние на различные системы организма. Ранее была установлена высокая терапевтическая эффективность биядерного динитрозильного комплекса железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-Г) в отношении эндометриоза у крыс.

**Цель работы.** Экспериментальная оценка противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-Г и в ЭПР исследовании тканей опухоли и органов (печень, лёгкие, селезёнка, мозг, кровь) мышей.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 80 самках мышей BDF<sub>1</sub>, с массой тела 18 – 20 г (питомник РАМН «Столбовая»). Опухолевой тест-системой служила карцинома лёгких Льюис, перевиваемая подкожно в соответствии со стандартной методикой. Измерения спектров ЭПР проводили на модифицированном радиоспектрометре «Радиопан» (Польша) при температуре жидкого азота (77К). Водный раствор Б-ДНКЖ-Г вводился мышам в/б десятикратно, начиная с следующих суток после перевивки опухоли, в диапазоне разовых доз от 20 до 170 мг/кг. Противоопухолевый эффект терапии, оцениваемый при сопоставлении кинетики развития опухолей в группах леченных и контрольных животных, характеризовался с помощью коэффициента торможения роста опухоли (ТРО, %).

**Результаты и выводы.** Установлена противоопухолевая активность Б-ДНКЖ-Г, которая проявлялась в торможении роста карциномы Льюис на 60 – 80 % по сравнению с контролем, изменяясь в зависимости от дозы препарата и сроков оценки эффекта. Методом ЭПР обнаружено избирательное накопление Б-ДНКЖ-Г в опухоли у леченых животных. Наряду с этим зарегистрировано накопление нитрозильных комплексов гемопротеинов в опухолях у леченых и контрольных животных. Предполагается, что противоопухолевый эффект динитрозильных комплексов железа обусловлен инактивацией гем-содержащих белков, обеспечивающих анти-нитрозативную защиту в опухолях, под влиянием NO, высвобождающегося из Б-ДНКЖ-Г.

*И.Н. Павлова<sup>1</sup>, О.М. Конопацкова<sup>2</sup>, Ю.П. Дугин<sup>1</sup>*

### **ИММУНОМОНИТОРИНГ И КОРРЕКЦИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ**

<sup>1</sup>НУЗ Дорожная клиническая больница на станции Саратов П ОАО РЖД, Саратов

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского МЗ России, Саратов

**Цель исследования.** Оценить эффективность иммунотерапии нуклеиновыми препаратами у больных раком мочевого пузыря.

**Материалы и методы.** Оценка иммунологического статуса и эффективность коррекции нуклеиновыми препаратами проведена у 80 больных раком мочевого пузыря. Преобладали мужчины – 72,6 %, возраст пациентов – чаще – 60 – 65 лет – 53,7 %. Окончательно стадия заболевания была следующей: pT2aN0M0 – у 41,4 %, pT2bN0M0 – у 34,5 %, pT3aN1M0 – у 13,8 %, pT3bN1M0 – у 10,3 %. Иммунотерапия проводилась нуклеином натрия (0,5\*3 раза в день, 10 дней), ферровиром (5мл, в/м, 10 дней) и неовиром (12,5 % – 2,0, в/м, через 48 часов, 10 введений).

**Результаты.** При исходном исследовании иммунологического статуса у 72,4 % больных констатировано увеличение количества лейкоцитов в 1,2 раза, тенденция к снижению абсолютного и относительного содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, а также снижение процентного содержания CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. Улучшение показателей иммунитета при коррекции указанными препаратами отмечено через три месяца. Констатировано увеличение количества Т-лимфоцитов и снижение супрессорной активности клеток к концу первого года лечения, по сравнению с исходными данными, что является благоприятным прогностическим признаком. К концу первого года коррекции у больных группы, в которой не было проявлений прогрессирования, констатирована тенденция к нормализации показателей. Среди пациентов с появившимися рецидивами в течение года после окончания лечения, отмечено, что исходные показатели иммунитета были значительно снижены, улучшение происходило на фоне иммуномодуляции, однако ответ был менее выражен. В группе с прогрессированием наблюдались нестабильные, разнонаправленные показатели. В первый год умерло 2 человека.

**Вывод.** Выраженный иммуномодулирующий эффект применения нуклеиновых препаратов в сочетании с индукторами интерферона способствует длительному безрецидивному течению заболевания.

*И.В. Паниченко, В.Н. Богатырёв, В.В. Кузнецов, М.И. Нечушкин, Е.С. Макаров*

### **КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

### **МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОК ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ (РЯ)**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Материалы и методы.** В исследование включены 309 больных РЯ I – IV стадий. Исследования ДНК в клеточной популяции проводили на лазерном проточном цитометре «EPICS-XL» («Coulter», США).

**Результаты.** Диплоидный тип опухоли выявлен у 77 (24,9 %) больных, у 232 (75,1 %) – анеуплоидный. Анеуплоидные опухоли достоверно чаще определялись у пациентов с III-IV стадиями заболевания, в серозных или светлоклеточных аденокарциномах, а также в опухолях с низкой степенью дифференцировки. Среди больных с анеуплоидным типом опухоли полный эффект от проводимой химиотерапии достигнут в 97 (57,0 %) наблюдениях, в то время как среди больных с диплоидными опухолями – у 46 (83,6 %) пациенток, ( $p < 0,05$ ). Вместе с тем прогрессирование основного заболевания отмечено только у 4 (7,3 %) больных с диплоидными опухолями, в то время как у каждой четвертой пациентки с анеуплоидными опухолями отмечено прогрессирование основного заболевания на фоне проводимого лечения – 44 (25,9 %). При сопоставлении отдалённых результатов лечения больных РЯ с количественными параметрами клеток опухолей оказалось, что среди 77 больных РЯ с диплоидными опухолями в течение 5 лет наблюдения были живы  $66,8 \pm 6,6$  % женщин, в то время как среди 232 пациенток с анеуплоидными опухолями – всего лишь  $24,4 \pm 3,3$  % больных, ( $p < 0,05$ ). Исследование уровня делеций в хромосомных локусах с использованием микросателлитных маркёров показало, что в локусах 11p15, 17q12-21 локализованы гены-супрессоры, участвующие в процессе канцерогенеза и прогрессии опухолей у больных серозным и муцинозным раком яичников. Уровень экспрессии p53-mut в опухолевых клетках коррелирует со стадией заболевания, индексом ДНК и степенью дифференцировки опухолей у больных РЯ.

**Заключение.** Определение перечисленных выше молекулярно-биологических маркёров показало, что злокачественные эпителиальные новообразования яичников различны по своему клиническому течению, что имеет большое значение для прогнозирования течения заболевания и выработки индивидуальной лечебной тактики.

*И.В. Паниченко, И.Б. Зборовская, В.Н. Богатырёв, М.И. Нечушкин, Е.С. Макаров*

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЛЕЦИЙ В ХРОСОМНЫХ ЛОКУСАХ ОПУХОЛЕЙ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва.*

**Цель исследования.** Определить потерю гетерозиготности и микросателлитную нестабильность в зонах локализации генов-супрессоров, ассоциированных с развитием и прогрессией рака яичников (РЯ).

**Материалы и методы.** В опухолях 80 больных оценивали генетическую нестабильность (потерю гетерозиготности) в пяти хромосомных локусах (1p32-36, 7q31.1-3, 11p15, 17q12-21, 18q21-23) с использованием 19 микросателлитных маркеров при помощи полимеразной цепной реакции.

**Результаты:** делеции в локусе 7q31-53, 11p15, 17q12-21 возникают чаще в злокачественных опухолях по сравнению с пограничными и доброкачественными новообразованиями, что, по нашему мнению, указывает на наличие в этих областях генов-супрессоров, являющихся одним из звеньев канцерогенеза. Чаще всего частота потери гетерозиготности обнаружена в локусе 17q12-21 – 77,8 %, а реже всего (20,4 %) – в 1p32-36. Высокая частота делеций в локусе 17q12-21 может свидетельствовать о том, что ген *BRS1* вовлечён в канцерогенез не только наследственных, но и спорадических форм РЯ. Невысокая, близкая к фоновой, потеря гетерозиготности в локусах 1p32-36, 18q21-23 практически исключает наличие в этих областях генов, участвующих в канцерогенезе при РЯ. При анализе зависимости количества делеций с учётом стадии заболевания, выявлена тенденция увеличения потери гетерозиготности практически во всех изучаемых локусах при III-IV стадиях болезни. Не выявлено корреляции между степенью дифференцировки опухолей и количеством делеций во всех изучаемых локусах. При анализе результатов 5-летней общей и безрецидивной выживаемости оказалось, что имеются достоверные различия между группами пациентов в опухоли которых определялись делеции и без таковых в локусах 11p15 и 17q12-21.

**Заключение.** Полученные данные о разнице в частоте потери гетерозиготности в злокачественных новообразованиях яичников позволяют более полно охарактеризовать отдельные гистологические типы опухолей с молекулярно-генетической точки зрения, определить локусы, содержащие онкогены и гены-супрессоры, участвующие в канцерогенезе при РЯ, с клинической точки зрения - выделить группу пациентов с неблагоприятным прогнозом.

*А.А. Панкратов<sup>1</sup>, Т.Н. Андреева<sup>1</sup>, Р.И. Якубовская<sup>1</sup>, Д.Ю. Логунов<sup>2</sup>, М.М. Шмаров<sup>2</sup>, А.Д. Каприн<sup>1</sup>*

### ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С АДЕНОВИРУСНЫМ НОСИТЕЛЕМ

<sup>1</sup>ФГБУ «ФМИЦ им. П.А.Герцена» МЗ РФ, Москва

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ, Москва

**Цель исследования.** Оценка общетоксических свойства ряда генотерапевтических препаратов, где в качестве носителя генетического материала использовался модифицированный аденовирус 5-го серотипа.

**Материалы и методы.** Исследовали препараты АдеЛакт (экспрессирующий ген лактоферрина человека), АдеВаск (экспрессирующий гены фактора роста эндотелия сосудов и ангиогенина человека) и АдеВакФлю (экспрессирующий гены гемагглютининов вирусов гриппов). Эксперименты проводили на мышах, крысах, морских свинках и кроликах. Исследования проводили с использованием методов экспериментальной токсикологии.

**Результаты.** При изучении «острой» токсичности установлено, что МПД препаратов АдеЛакта и АдеВаска превышала эквитерапевтическую дозу для человека (ЭТД<sub>ч</sub>) в 50 – 100 раз; КВЧ – 1 – 2, а нетоксическая максимально введенная доза препарата АдеВакФлю превышала ЭТД<sub>ч</sub> более чем 3000 раз.

При изучении «хронической» токсичности показано, что препараты АдеЛакт и АдеВаск в высокой токсической дозе (ВТД=МПД), которая превышала ЭТД<sub>ч</sub> в 100 раз, оказывали умеренное и обратимое токсическое действие на легкие, печень и почки. Применение препарата АдеВакФлю в дозе, превышающей ЭТД<sub>ч</sub> в 1428 раз, по данным клинико-лаборных и патологоанатомических исследований (включающих гистологические исследования) не оказывало токсического действия на внутренние органы и системы организма.

**Заключение.** Таким образом, препараты АдеЛакт и АдеВаск по степени опасности «острого» токсического действия являются «малоопасными лекарственными средствами», а «хронического» – «умеренно опасными». Препарат АдеВакФлю охарактеризован как «малоопасное лекарственное средство».

*И.В. Пантющенко<sup>1</sup>, С.И. Тихонов<sup>1</sup>, П.В. Островерхов<sup>1</sup>, А.В. Морозова<sup>1</sup>, П.Г. Рудаковская<sup>2</sup>, А.В. Старовойтова<sup>3</sup>, А.Г. Мажуга<sup>2</sup>, М.А. Грин<sup>1</sup>*

### **НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ ИК-ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *a* ДЛЯ ФДТ РАКА**

<sup>1</sup>МИТХТ имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup>МРНЦ им. А.Ф. Цыба, Обнинск, Калужская обл.

**Актуальность.** Основными методами лечения в онкологии являются хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия. Однако в последние два десятилетия все большее распространение получают новые методы, среди которых следует отметить фотодинамическую терапию (ФДТ), которая является результатом комбинированного действия трех нетоксичных компонентов – фотосенсибилизатора, света и кислорода. Применение наночастиц золота с иммобилизованными на них фотосенсибилизаторами открывает новые возможности для повышения результативности фотодинамической терапии. Наночастицы золота обладают целым рядом уникальных характеристик, таких как оптические свойства, прочность, высокая площадь поверхности, химическая инертность и способность противостоять окислению даже в ультрадисперсном (наноразмерном) состоянии.

**Материалы и методы.** В настоящей работе получено новое серосодержащее производное бактериохлорофилла *a*. Последний был выделен из биомассы несерных пурпурных бактерий *Rhodobacter capsulatus* штамм В10. Предлагаемый фотосенсибилизатор представляет собой *N*-аминобактериопурпуринимид, экзоциклическая аминогруппа которого ацилирована остатком липоевой кислоты, являющейся биогенным соединением, выполняющим в организме функцию кофактора пируватдегидрогеназного и альфа-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов. Благодаря наличию дисульфидной группировки в молекуле липоевой кислоты, пигмент приобрел ауروفильные свойства и был иммобилизован на поверхности наночастиц золота (НЧ-Au) за счет образования связей S-Au. Форма и размеры полученных частиц с иммобилизованным фотосенсибилизатором (ФС-Au) определены методами динамического светорассеяния (ДСР) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Наноструктурированный ФС представляет собой сферы с гидродинамическим диаметром 100-110 нм, поглощает свет в области 824 нм и интенсивно флуоресцирует при 830 нм, что позволило изучить кинетику его распределения в органах, здоровых и опухолевых тканях у животных-опухоленосителей.

**Результаты и выводы.** Сравнение биологических свойств свободного (ФС) и иммобилизованного (ФС-Au) пигментов в экспериментах на крысах с саркомой М-1 показало, что иммобилизация бактериопурпуринимида на НЧ золота увеличивает время циркуляции наноструктурированного ФС в кровотоке и повышает его тропность к опухоли за счет неспецифического таргетинга, включающего экстравазацию наночастиц, нагруженных пигментом, из дефектных сосудов опухоли.

### **И.А. Пасова, Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Н.В. Селиванова, Д.В. Кудрявцев, А.Д. Каприн** **ВЛИЯНИЕ ИМУНОТЕРАПИИ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ NKG2D И ИХ ЛИГАНДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ МЕЛАНМОЙ**

*МРНЦ им. А.Ф. Цыба - филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск, Калужская обл.*

**Актуальность.** Методы иммунотерапии (ИТ) направлены на активацию противоопухолевой активности и усиление эффекторного звена иммунного ответа. Стресс-индуцированные молекулы MICA, появляющиеся на поверхности опухолевых клеток при их трансформации и участвуют в противоопухолевом иммунном ответе за счет активации NK-клеток через NKG2D.

**Цель и задачи.** Оценить экспрессию NKG2D на лимфоцитах и уровень лигандов MICA в сыворотке крови больных меланомой до и после проведения ИТ активированными лимфоцитами.

**Материалы и методы.** Сопроводительная ИТ активированными лимфоцитами проводилась 20 больным с метастатической меланомой. Уровень MICA оценивали с помощью ИФА, количество NK-клеток и рецептора NKG2D определяли с помощью проточной цитометрии.

**Результаты.** До лечения среднее количество циркулирующего MICA в сыворотке крови больных составило 1948 пг/мл. У 15 % пациентов уровень регуляторных молекул не превышал контрольных значений, у 70 % пациентов варьировал от 1000 – 3000 пг/мл, у 15 % – превышал 5000 пг/мл. После сопроводительной ИТ уровень MICA увеличился у 28,6 % больных, что было связано с прогрессией заболевания, и не изменился у 42,8 %, что характеризовалось стабилизацией процесса. Среднее содержание активирующего рецептора NKG2D на всех лимфоцитах не изменилось, а на NK-клетках несколько снизилось с 16 % до 13 %, что возможно связано с их ингибированием за счет sMICA.

**Выводы.** У больных меланомой уровень sMICA резко возрастает. При увеличении уровня sMICA до 5000 пг/мл у больных меланомой отмечается рецидив заболевания, несмотря на проведенное лечение.



Э.Р. Переверзева<sup>1</sup>, В.Ю. Балабаньян<sup>2</sup>, С.Э. Гельперина<sup>3</sup>

### ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА ДОКСОРУБИЦИН НАНОСОМАЛЬНЫЙ

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИНА», Москва

<sup>2</sup>ООО «Технология лекарств», Москва

<sup>3</sup>ООО «Наносистема», Москва

**Цель исследования.** Оценка влияния препарата Доксорубицин наносомальный (НаноДокс) (ООО «Технология лекарств», Россия) на структуру внутренних органов кроликов в сравнении с препаратом Адрибластин быстрорастворимый (Актавис, Италия) (Адр).

**Материалы и методы.** Исследования проведены на самцах и самках кроликов породы Советская Шиншилла. Препараты вводили внутривенно ежедневно 30 дней в дозах, суммарно составляющих ЛД<sub>50</sub> и МПД. На 1 и 30 сутки после курса животных вскрывали. Участки органов и тканей подвергали патоморфологическому исследованию.

**Результаты.** Показано, что основными видами побочного действия НаноДокс, также, как Адр, являются кардио-, гепато-, нефро-, гонадо- и гастроинтестинальная токсичность. Признаки повреждения миокарда под действием НаноДокс были выражены значительно слабее. Особенность реакции ткани печени на введение НаноДокс - активация купферовских клеток. По сравнению с Адр, НаноДокс в меньшей степени повреждал канальцевую, но в большей – клубочковую систему почки. В отличие от Адр, применение НаноДокс не вызывало деструктивных изменений в семенниках.

**Выводы.** Изменения структуры внутренних органов кроликов, возникающие под действием НаноДокс, зависят от величины примененной дозы и носят обратимый характер. Препарат рекомендован для клинических испытаний.

Э.Р. Переверзева<sup>1</sup>, Е.В. Возняковская<sup>1</sup>, Т.Б. Переверзева<sup>1</sup>, В.Ю. Балабаньян<sup>2</sup>, В.А. Разживина<sup>2</sup>,  
С.Э. Гельперина<sup>3</sup>, И.Д. Трещалин<sup>1</sup>

### ХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ПРЕПАРАТА ДОКСОРУБИЦИН НАНОСОМАЛЬНЫЙ НА КРОЛИКАХ

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИНА», Москва

<sup>2</sup>ООО «Технология лекарств», Москва

<sup>3</sup>ООО «Наносистема», Москва

**Цель исследования.** Изучение хронической токсичности препарата Доксорубицин наносомальный (НаноДокс) (ООО «Технология лекарств», Россия) в сравнении с препаратом Адрибластин быстрорастворимый (Pfizer, Italy) (Адр).

**Материалы и методы.** Исследования проведены на самцах и самках кроликов породы Советская Шиншилла. Препараты вводили внутривенно в краевую вену уха ежедневно 30 дней в дозах, суммарно составляющих ЛД<sub>50</sub> и МПД. Параметры исследования: изменение массы тела, ЭКГ, клинический и биохимический анализ крови, суточный диурез, клинический анализ мочи.

**Результаты.** Установлено, что введение НаноДокс хорошо переносится животными. В отличие от Адр, снижение массы тела у животных, получавших НаноДокс, было отмечено только у самок. Под действием НаноДокс лейкоцитопения развивалась на более поздние сроки и сохранялась менее длительно. Оба препарата вызывали повышение активности АСТ. Курсовое введение Адр приводило к развитию сердечной недостаточности, что выражалось в изменениях ЭКГ и уменьшении массы сердца. Кардиотоксического действия НаноДокс по этим показателям не выявлено. Применение НаноДокс не приводило к развитию алопеции.

**Выводы.** По токсическим свойствам НаноДокс обладает преимуществами по сравнению с Адр.

Э.Р. Переверзева<sup>1</sup>, М.И. Трещалин<sup>1</sup>, К.К. Николаева<sup>1</sup>, Н.В. Ерёмкин<sup>1</sup>, В.Ю. Балабаньян<sup>2</sup>, В.А. Разживина<sup>2</sup>, С.Э. Гельперина<sup>3</sup>, И.Д. Трещалин<sup>1</sup>

### ХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ПРЕПАРАТА ДОКСОРУБИЦИН НАНОСОМАЛЬНЫЙ НА КРЫСАХ

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИНА», Москва

<sup>2</sup>ООО «Технология лекарств», Москва

<sup>3</sup>ООО «Наносистема», Москва

**Цель исследования.** Изучение хронической токсичности препарата Доксорубицин наносомальный (НаноДокс) (ООО «Технология лекарств») в сравнении с субстанцией доксорубицина (Докс).

**Материалы и методы.** Исследования проведены на крысах линии Wistar. Препараты вводили интраперитонеально ежедневно 30 дней в дозах, суммарно составляющих ЛД<sub>50</sub>, МПД, ½ МПД. Параметры исследования: масса тела, ЭКГ, клинический и биохимический анализ крови, суточный диурез и клинический анализ мочи.

**Результаты.** Животные хорошо переносили введения препаратов, нормально прибавляли в массу тела. В отличие от Докс, применение НаноДокс не приводит к развитию тахикардии и увеличению интервала QT. Уменьшение общего количества лейкоцитов у крыс, получавших НаноДокс в дозах, суммарно составляющих МПД и ЛД<sub>50</sub>, было обнаружено только на 1 сутки после курса, тогда как у животных, получавших Докс, оно возникало уже во время курса и сохранялось в течение 10-15 дней. В отличие от Докс, применение НаноДокс не приводило к развитию эритроцитопении. Оба препарата вызывали повышение активности АСТ.

**Выводы.** По сравнению с субстанцией Докс, гематотоксичность НаноДокс выражена слабее, кардиотоксичность не выявлена.

А.Д. Перенков, Д.В. Новиков, А.В. Алясова, А.Ю. Барышников, В.В. Новиков

### УРОВЕНЬ мРНК CD38 В ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

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

**Актуальность.** Молекула CD38 обладает ферментативной активностью в отношении цАДР и является молекулой адгезии. Экспрессия белка CD38 на мембране клеток используется в качестве прогностического и диагностического маркера при лейкомиях, миеломе и хроническом лимфолейкозе.

**Цель работы.** Изучение уровня мРНК CD38 в опухолевых очагах больных раком толстой кишки. **Материалы и методы.** В работе использовали 54 образца опухоли больных раком и 6 перевиваемых линий опухоли толстой кишки. Уровень мРНК CD38 исследовали с помощью ПЦР в реальном времени. **Результаты.** В опухолевых очагах больных раком толстой кишки полноразмерная форма мРНК CD38 присутствует в 78 % случаев, альтернативная лишь в 52 % случаев. Уровень мРНК CD38 в опухолевых очагах в 7 – 9 раз ниже, чем в периферической крови тех же больных. Уровень полноразмерной формы мРНК выше уровня альтернативной во всех очагах опухоли больных. В клеточных линиях, имеющих происхождение из опухоли толстой кишки, уровень обеих форм мРНК гена CD38, ниже чем в очагах опухоли больных в 5 – 6 раз.

**Выводы.** Полученные результаты могут указывать на неоднородность очагов опухоли. Так, известно присутствие инфильтрирующих опухоль Т-лимфоцитов, которые несут молекулу CD38.

А.Д. Перенков<sup>1</sup>, Д.В. Новиков<sup>1</sup>, С.В. Шумилова<sup>1</sup>, Н.Н. Гурина<sup>1</sup>, А.Ю. Барышников<sup>2</sup>, В.В. Новиков<sup>1</sup>

### ЭКСПРЕССИЯ МИНИАНТИТЕЛА ПРОТИВ МУЦИНА 1 В КЛЕТКАХ E.COLI

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

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

**Актуальность.** Муцины 1 (MUC1) характеризуются гиперэкспрессией и измененным профилем гликозилирования в клетках большинства карцином. Эти свойства позволяют использовать MUC1 в качестве перспективного антигена для иммунотерапии рака.

**Цель исследования.** Получить миниантитела против MUC1.

**Материалы и методы.** В работе использовали гибридому ICO-25, продуцирующую моноклональные антитела против MUC1, предоставленные ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина».

**Результаты.** Были определены нуклеотидные последовательности мРНК, кодирующие вариабельные регионы легкой и тяжелой цепи антител. Методом ПЦР получена генетическая конструкция, в которой легкая и тяжелая цепи объединены в одну молекулу через шарнирный регион. Полученную кДНК лигировали с плазмидой pET22b и использовали для экспрессии миниантитела против MUC1 в штаммах E.coli BL21Codon plus (DE3), Lemmo21 (DE3) и Rosetta2 (DE3).

**Выводы.** Сравнение продукции рекомбинантного миниантитела между штаммами E.Coli методом электрофореза в ПААГ показало, что наибольшее количество белка регистрировалось в штамме BL21Codon plus (DE3). В настоящее время проводится оптимизация экспрессии и разработка методов очистки миниантитела против MUC1.

П.С. Петров, Н.А. Пятаев, В.А. Васин, А.А. Буртасов, О.В. Минаева, А.В. Кокорев, А.В. Заборовский

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ОРМУСТИН

#### В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», Саранск

**Цель работы.** Разработка метода количественного определения концентрации противоопухолевого препарата «Ормустин» в биологических средах.

**Материалы и методы.** Ормустин представляет собой производное нитрозометилмочевины, представленное двумя изомерами: (N<sup>δ</sup>-нитрозо-N<sup>δ</sup>-[N<sup>γ</sup>-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитин и N<sup>δ</sup>-[N<sup>γ</sup>-нитрозо-N<sup>γ</sup>-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитин). Особенности субстанции Ормустина, которые технически усложняют его количественное определение в биосредах, являются: 1) химическая нестабильность при комнатной температуре; 2) наличие двух изомеров, обладающих различной химической устойчивостью. При хроматографическом определении Ормустина с помощью УФ-детектирования в водном растворе определяется 2 пика, соответствующих первому и второму изомерам, причем площадь пиков пропорциональна их концентрации. Как известно, УФ-детектирование неприменимо для белок-содержащих сред и требует экстракции аналита из матрицы. Однако вследствие нестабильности Ормустина обеспечить его адекватную жидкостную экстракцию из плазмы не удалось, поэтому для выделения был использован метод ультрафильтрации. Хроматографирование ультрафильтрата с УФ-детектированием оказалось непригодным вследствие наличия большого количества примесей, и для анализа был использован масс-спектрометрический детектор, который обеспечивал хорошую чувствительность и достаточный диапазон линейности. При масс-спектрометрическом детектировании площади пиков изомеров ормустина были пропорциональны не только концентрации, но и зависели от сродства молекул к ионизации и стабильности образующихся молекулярных ионов. Это требовало дополнительного подбора параметров ионизации, обеспечивающих соотношение площадей пиков, пропорциональное концентрации изомеров. В итоге были подобраны следующие параметры хроматографирования: колонка Kromasil 100 C18, 150\*2 мм, подвижная фаза этанол – ацетат аммония (рН 6,2) (10:90), ионизация – ESI (газ-небулайзер – азот при 350 °С, напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 40 В, детектирование: по положительному иону m/z=267); время удержания Ормустина-I ~ 4,6 мин., Ормустина-II ~ 6,6 мин. при T=25 °С.

**Результаты и выводы.** Разработан метод количественного определения противоопухолевого препарата «Ормустин» в биологических средах с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Нижний предел количественного определения составил 40 нг/мл для изомера I и 20 нг/мл для изомера II, диапазон линейности 40 – 100000 нг/мл для изомера I и 20 – 50000 нг/мл для изомера II.

Работа выполнена в рамках Госзадания ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева. Проект № 2952

*Е.А. Плотникова<sup>1</sup>, Н.Б. Морозова<sup>1</sup>, А.П. Ластовой<sup>2</sup>, Е.А. Макарова<sup>2</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>2</sup>, Р.И. Якубовская<sup>1</sup>*  
**ПРЕИМУЩЕСТВА ДЛИННОВОЛНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ  
 ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ БОЛЬШОГО РАЗМЕРА**

<sup>1</sup>ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, Москва

<sup>2</sup>ФГУП ГНЦ НИОПИК, Москва

**Актуальность.** На протяжении последнего десятилетия ведётся активный поиск фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ), поглощающих в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра, продукты облучения которых способны воздействовать на опухолевую ткань на глубине более 2 см, что открывает возможность лечения объемных и глубокозалегающих злокачественных новообразований.

**Задачи исследования.** Сравнительное изучение эффективности ФДТ с использованием нового ФС тетра-3-пиридилбактериохлорина ( $\lambda_{\max} = 747$  нм) и официального препарата на основе хлорина  $e_6$  «Радахлорин» ( $\lambda_{\max} = 662$  нм) у животных с опухолью большого размера.

**Материалы и методы.** ФДТ проводили у мышей F1 с саркомой S37 объёмом более 400 мм<sup>3</sup>, привитой подкожно на бедро, при полипозиционном облучении светодиодными источниками ( $\lambda = 740 \pm 28$  нм и  $662 \pm 14$  нм, соответственно) при плотности энергии на 1 поле 90 Дж/см<sup>2</sup>,  $\Sigma$  доза света – 270 Дж/см<sup>2</sup>.

**Результаты.** При оптимальных режимах проведения ФДТ выявлена значительно более высокая противоопухолевая активность тетра-3-пиридилбактериохлорина (ТРО 86 – 100 %, УПЖ 54 – 117 % и КИ 17 – 40 %) по сравнению с препаратом «Радахлорин» (ТРО 23 – 81 %, УПЖ 23 – 37 % и КИ – 0 %).

**Выводы.** Приведены экспериментальные доказательства преимущества длинноволнового ФС тетра-3-пиридилбактериохлорина по сравнению с «Радахлорином» при лечении опухолей большого размера.

*Н.В. Позднякова, А.В. Смирнова, О.О. Рябая*

**МИЦЕЛЛЯРНЫЕ ФОРМЫ РЕНТГЕНОКОНТРАСТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** Использование рентгеноконтрастных веществ для диагностических и терапевтических целей нашло широкое применение в практике. В настоящее время ведется разработка новых препаратов, обладающих улучшенными свойствами.

**Цель и задачи.** Получение мицеллярных форм рентгеноконтрастных препаратов со сниженной общей токсичностью и увеличенным временем циркуляции в крови с использованием ретиноевой кислоты.

**Материалы и методы.** Конденсация ретиноевой кислоты с комплексообразователем (ДТПА) осуществлялась в два этапа. Сначала получали аминоксодержащее производное ретиноевой кислоты, затем проводили реакцию с диангидридом ДТПА. Для контроля этапов синтеза использовался адаптированный метод определения аминоксодержания. Состав конъюгата определяли спектрофотометрически с помощью тестового связывания с ионами меди. Мицеллы получали стандартным методом вытеснения органического растворителя из двухфазной системы с последующим диализом против фосфатно-солевого буфера. Размер наночастиц определяли методом динамического светорассеяния.

**Результаты и выводы.** Получен мицеллярный препарат, содержащий мицеллообразующее вещество полуксимер F-127 и рентгеноконтрастный компонент – конъюгат ретиноевой кислоты с хелатором ДТПА в комплексе с гадолинием. Эффективность включения конъюгата в мицеллы составляла от 40 до 87%. Препарат обладал узким диапазоном распределения наночастиц по размеру со средним диаметром 118 нм. Стабилен при хранении в течение как минимум 2 недель.

*Н.В. Полуконова<sup>1</sup>, Н.А. Наволокин<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>2</sup>, Э.Ш. Соломко<sup>2</sup>, Е.В. Степанова<sup>2</sup>, О.О. Рябая<sup>2</sup>, Г.Н. Маслякова<sup>2</sup>, А.Ю. Барышников<sup>2</sup>*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ  
 ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ IN VITRO**

<sup>1</sup>Государственный медицинский институт им. В.И. Разумовского, Саратов

<sup>2</sup>ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва

**Цель исследования.** Изучить противоопухолевую активность растительных экстрактов, содержащих флавоноиды: бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.), аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и антоциановых форм кукурузы обыкновенной (*Zea mays* L.)

**Материалы и методы.** Сырье собрано на территории Саратовской области, экстракты получены разработанным нами способом (Полуконова и др., 2012, 2013; Патент РФ № 2482863). Исследовали разные концентрации экстрактов. В исследованиях использовали культуры опухолевых клеток человека: Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, аденокарциному молочной железы MCF-7, карциному легкого A549, карциному простаты PC-3, карциному толстой кишки HCT-116, карциному молочной железы человека SK-BR-3, карциномы почки человека Saki-1 и Sn12c. Определение клеточной гибели проводили методом двойного окрашивания аннексин-ом и пропидием йодидом на проточном цитофлуориметре (FACSCantoII, Beckton Dickenson). Также анализировали клетки, окрашенные Hoechst, используя следующие показатели: среднее число клеток в поле зрения; активность роста культуры; абсолютное число митозов в поле зрения; процент клеток в митозе (общего числа клеток); индекс митотической активности; абсолютное число апоптозов в поле зрения; процент клеток в апоптозе (от общего числа клеток), индекс апоптотической активности; процент клеток с пикнозом ядра от общего числа клеток с признаками апоптоза; процент апоптотических телец от общего числа клеток с признаками апоптоза.

**Результаты и выводы.** Экстракты бессмертника, аврана и антоциановой кукурузы обладают противоопухолевой активностью in vitro. Активность изученных экстрактов при разных концентрациях в отношении разных клеточных линий неодинаковая. Экстракты бессмертника и аврана оказывали наиболее выраженное действие на опухолевые клетки. Перспективно дальнейшее исследование механизмов противоопухолевого действия экстрактов и их фракций.

*И.Р. Просалкова<sup>1</sup>, Ю.М. Букреев<sup>1</sup>, Н.К. Власенкова<sup>1</sup>, Л.Т. Мамедова<sup>1</sup>, В.В. Решетникова<sup>1</sup>, Н.Ю. Соколов<sup>2</sup>, А.В. Сергеев<sup>1</sup>*

### **ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО ЛИКОПИНА**

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА», МОСКВА

<sup>2</sup>ФГУ ГВКГ ИМ. Н.Н. БУРДЕНКО, МОСКВА

**Актуальность.** Каротиноид ликопин (ЛП) широко представлен в растительном мире и обладает экспериментально доказанной антиканцерогенной и противоопухолевой активностью.

**Цель исследования.** Изучение медико-биологических свойств разработанных нами на основе ЛП препаратов.

**Материалы и методы.** Препарат «ОлеоРОНЦ» (ОЛР) разработан на основе ЛП масел томатов и шиповника, «Коэнзим Q-10 плюс» (КЭП) разработан на основе ЛП и тыквенного масла, «Томатол» разработан на основе масла томатов. Со всеми перечисленными препаратами проведены необходимые фармацевтические исследования. Препараты разрешены для широкого использования через аптечную сеть. Антиканцерогенную, антимуtagenную и иммуномодулирующую активность определяли по ранее опубликованным методам.

**Результаты.** При систематическом ежедневном введении крысам Вистар вместе с кормом ОЛР или ЛП, или КЭП в различных дозах наблюдали снижение на 20 – 40 % частоты появления опухолей пищевода, желудка и печени, индуцированных химическим канцерогеном, увеличение на 15 – 35 % латентного периода возникновения опухолей и удлинение срока жизни животных. Препараты «Томатол» и ОЛР снижали на 20 – 35 % частоту хромосомных аберраций клеток костного мозга мышей и крыс, индуцированных циклофосфаном или химическим канцерогеном. Все препараты в различных дозировках увеличивали в 1,5 – 3 раза пролиферативную активность спленоцитов, цитотоксическую активность Т-киллеров и перитониальных макрофагов. Все препараты при систематическом введении животным повышали антиоксидантный и антиоксидантный потенциал организма.

**Выводы.** Разработанные нами препараты можно рассматривать как перспективные потенциальные средства для химиопрофилактики рака.

*В.А. Пурцхванидзе, П.Г. Орлова, Д.А. Сбоева*

### **ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВУЛЬВЫ В СОЧЕТАНИИ С ФОТОМОДИФИКАЦИЕЙ КРОВИ И БИОРЕВИТАЛИЗАЦИЕЙ ВУЛЬВЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ**

*ООО МЦВТ «ЛазерВита», Москва, Россия*

**Актуальность.** К предраковым заболеваниям вульвы относятся крауроз, лейкоплакия и остроконечные кондиломы (папилломы) вульвы. Этиология и патогенез этих заболеваний окончательно не установлены, часто у пациентов отмечается гипострогения и (или) нейроэндокринные нарушения, а также вирусная инфекция. Лейкоплакия и крауроз вульвы относятся к трудноизлечимым заболеваниям и почти в 50 % случаев приводит к раку вульвы.

**Цель работы.** Определение эффективности и безопасности фотодинамической терапии в сочетании с фотомодификацией крови и биоревитализацией вульвы гиалуроновой кислотой у пациентов с предраковыми заболеваниями вульвы.

**Материалы и методы.** Нами разработано комплексное лечение пациентов с фоновыми заболеваниями вульвы, сочетающее в себе несколько методов. Основным методом комплексного лечения являлась фотодинамическая терапия, обладающая цитотоксическим действием на предраковые и атипичные клетки. В качестве иммуномодулирующей терапии применялась фотомодификация крови. С целью профилактики проводилась биоревитализация вульвы гиалуроновой кислотой. Данное лечение проводилось 12 пациентам. Использовались фотосенсибилизаторы (ФС) Фотодитазин или Радахлорин. Способ введения – внутривенно, доза – 0,8 – 1,2 мг/кг, лекарственно-световой интервал – 3 часа, плотность энергии лазерного облучения – 150 – 200 Дж /см<sup>2</sup>. Параллельно проводилась фотомодификация крови (6 – 10 курсов), ФС – Фотодитазин или Радахлорин, доза – 0,5 – 1,0 мг/кг, мощность на конце световода – 2,0 мВт., продолжительность процедуры – 20 – 30 мин.). Биоревитализация гиалуроновой кислотой проводилась раз в полгода препаратом «BELLCONTOUR GVISC» (доза 1,6 мл.).

**Заключение.** По сравнению с традиционными методами лечения, комплексная терапия пациентов с фоновыми заболеваниями вульвы является наиболее эффективной. Благодаря комплексному подходу к лечению таких пациентов появилась возможность не только сохранить анатомо-функциональную целостность органа, но и избавить пациента от тяжёлых клинических проявлений заболевания, приводящих к истощению нервной системы пациента. Данный метод может быть успешно применён в качестве профилактики рака вульвы.

*Н.А. Пятаев, О.В. Минаева, Н.А. Зырняева, К.Г. Гуревич, А.В. Заборовский, А.В. Кокорев, А.А. Кладиев, П.П. Бычковский, М.Ю. Ревтович*

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ СВОБОДНОЙ И ПОЛИМЕР-СВЯЗАННОЙ ФОРМ ПРОСПИДИНА С ДОКСОРУБИЦИНОМ У КРЫС С АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМОЙ ЗАЙДЕЛА

*ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», Саранск  
ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва  
Белорусский Госуниверситет, Минск*

**Цель работы.** Исследовать противоопухолевую активность и оценить побочные и токсические эффекты комбинаций проспидин+доксорубицин и проспидин-гидрогель+доксорубицин у крыс с трансплантированной асцитной гепатомой Зайдела.

**Материал и методы.** Исследования выполнены на 72 белых лабораторных крысах обоего пола с трансплантированной асцитной гепатомой Зайдела. В зависимости от характера терапии животные были разделены на 6 групп (1 контрольную и 5 опытных, по 12 особей в каждой). В контрольной группе животные лечения не получали, в опытных проводилась химиотерапия по следующим схемам: 1-я – проспидин, водный раствор, 2-я – проспидин-гидрогель; 3-я – доксорубицин; 4-я – проспидин + доксорубицин; 5-я – проспидин-гидрогель + доксорубицин. При монокимиотерапии использовали максимально переносимые, при комбинированной химиотерапии – половинные от максимально переносимых доз препаратов. Для оценки противоопухолевой активности исследовали: летальность, летальность от прогрессирования опухоли, частоту полного излечения; среднюю продолжительность жизни и увеличение продолжительности жизни. Для оценки побочных и токсических эффектов проводили исследование клеточного состава и биохимических показателей крови.

**Результаты и выводы.** Установлено, что при асцитной гепатоме Зайдела комбинация водного раствора проспидина с доксорубицином по противоопухолевой активности не превосходит монотерапию доксорубицином. Побочные эффекты данной комбинации соответствуют таковым у доксорубицина и представлены лейко- и тромбоцитопенией и нефропатией. Эффект комбинации проспидин+доксорубицин можно охарактеризовать как аддитивный (сумму эффектов каждого из препаратов в отдельности). Учитывая сохранение токсичности, можно констатировать, что данная схема не обладает преимуществами перед монокимиотерапией ДР. При комбинации проспидин-гидрогеля с доксорубицином отмечался синергизм эффектов: противоопухолевый эффект комбинации по влиянию на летальность достоверно более выражен, чем у каждого из ее компонентов. Комбинация отличалась достоверно меньшей гематотоксичностью по сравнению с наиболее токсичным из ее составляющих.

*Работа выполнена в рамках Госзадания ФГБОУ ВПО «МГУ им.Н.П.Огарева», код проекта 2952.*

*Н.А. Пятаев, О.В. Минаева, Г.С.Столяров, О.А.Куликов, Н.Н. Зырняева, А.В. Кокорев, А.В. Заборовский, С.А. Фирстов, Р.М. Евсеев, В.П. Краснов*

### ФАРМАКОКИНЕТИКА И ТКАНЕВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ХИМИОПРЕПАРАТА ОРМУСТИН

*ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», Саранск  
ФГБУН ИОС УрО РАН, Екатеринбург*

**Цель работы.** Исследование фармакокинетики и тканевого распределения противоопухолевого химиопрепарата Ормустин.

**Материал и методы.** В исследовании использован опытный образец препарата Ормустин (ИОС УрО РАН), который представляет собой производное природной аминокислоты *L*-орнитина и состоит из двух изомеров, соотношение которых в препарате составило 76,7:23,3. Исследования выполнены на мышах C57B6 с перивитой карциномой легкого Льюиса. Животным на 8-е сутки после трансплантации опухоли внутривенно вводили Ормустин в дозе 40 мг/кг. Концентрацию препарата определяли на следующих временных точках: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 и 180 минут (по 6 животных на точку). Кинетика исследовалась в следующих органах и биологических жидкостях: плазма крови, легкое, печень, селезенка, почка, головной мозг, опухолевая ткань, моча, фекалии. Ормустин из плазмы и гомогенатов органов выделяли методом ультрафильтрации. Анализ концентрации проводили методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (хроматографический комплекс Konik K2). В пробах определяли оба изомера Ормустина. Фармакокинетические константы рассчитывали с помощью программы Kinetica.

**Результаты и выводы.** Кинетические кривые обоих изомеров Ормустина в плазме и в других исследованных органах наиболее адекватно описывались биэкспоненциальной моделью. Концентрация ормустина в плазме пропорциональна количеству введенного препарата. Ормустин достаточно быстро выводился из плазмы крови. Значения фармакокинетических констант в плазме для Ормустина I составили:  $C_{max} - 33,9 \pm 11,4 \text{ мкг/мл}$ ,  $AUC - 69,2 \text{ мкг*мин/мл}$ ,  $t_{1/2} - 3,6 \text{ мин}$ ,  $Cl - 0,000 \text{ мл/мин}$ ; для Ормустина II были равны:  $C_{max} - 10,2 \text{ мкг/мл}$ ,  $AUC - 2,83 \text{ мкг*мин/мл}$ ,  $t_{1/2} - 8,0 \text{ мин}$ ,  $Cl - 0,04 \text{ мл/мин}$ . Получены следующие значения коэффициентов ткань/плазма по AUC: почка – 5,71, опухолевая ткань – 1,66, печень – 1,10, легкое – 1,08, селезенка – 0,94, головной мозг – 0,64. Экскреция препарата с мочой составила 32,1 – 35,3 % от введенной дозы соответственно для первого и второго изомеров. В фекалиях препарат не определялся. Анализ дозозависимых констант Ормустина показал, что системная кинетика препарата сходна с рядом других производных нитрозометилмочевины (кармустином, лизомустином). Отличительной особенностью Ормустина является несколько большая степень проникновения в ткань мозга.

*А.О. Райков<sup>1,2</sup>, А.А. Матюшин<sup>1</sup>, И.И. Краснюк<sup>1</sup>*

### ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОГО МИТОКСАНТРОНА

<sup>1</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

**Цель исследования.** Получение липосомальной лекарственной формы митоксантрона с диаметром везикул 100–115 нм методом экструзии.

**Материалы и методы.** Субстанция митоксантрона (1,4 – дигидрокси-5,8-бис[2-(2-гидроксиэтиламино) этиламино] – антрацен-9,10-диона дигидрохлорид) (ООО «Синбиас Фарма», Украина), Фосфатидилхолин (S PC-3)(Lipoid, Германия); 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-карбонил-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PE 18:0/18:0 – PEG 2000) (Lipoid, Германия); Холестерин (Sigma aldrich, США). Липосомы получали методом обращения фаз с последующим пропусканием через поликарбонатные мембранные фильтры с диаметром пор 400, 200 и 100 нм в различных условиях, загрузка производилась с использованием градиента сульфата аммония. Очистка загруженных липосом от невключенного митоксантрона производилась методом гелевой фильтрации на сорбенте G-50 standart (колонка C10/20). Анализ среднего диаметра полученных везикул и оценку их распределения по размерам проводили с использованием метода корреляционной спектроскопии светорассеяния (динамического лазерного светорассеяния) с помощью прибора Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.

**Результаты.** При получении липосом были исследованы различные смеси липидов. Лучшими характеристиками (размер, процент включения) обладала смесь липидов следующего состава S PC-3:Chol: mPEG2000-DSPE (6:3:1). При пропускании данной смеси при температуре 25 °С получены липосомы с средним размером везикул 125±6 нм, размер липосом данной смеси липидов был уменьшен до 105±6 нм, использованием нагревания до температуры 55 °С в процессе экструзии. Оптимальные результаты загрузки липосом данного состава были получены при использовании 300 мМ сульфата аммония (рН 5,5) и инкубации липосом с митоксантроном при температуре 45 °С, в качестве загрузочного буфера использовался 10 мМ HEPES и 145 мМ раствор хлорида натрия (рН 8,2-8,4), весовое соотношения препарат : суммарные липиды составило 0,12:1.

**Выводы.** В результате исследования удалось получить липосомальную лекарственную форму митоксантрона с диаметром везикул 105±6 нм. Оработан оптимальный липидный состав для получения липосом заданного размера. Оптимизированна процедура загрузки липосом митоксантроном.

*А.В. Решетников*

### СОВРЕМЕННЫЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

*НИИ социологии медицины, экономики здравоохранения и медицинского страхования ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва*

**Актуальность.** В 2014 – 2015 гг. было проведено медико-социологическое исследование «Изучение мнения пациентов о работе медицинской организации, внедрении новых лекарственных средств и методов терапии».

**Цель исследования.** Изучение отношения пациентов к внедрению новых лекарственных средств и методов терапии.

**Материалы и методы.** Метод – анкетный опрос, выборка – 336 респондентов, имеющих онкологическое заболевание и получающих химиотерапию с включением в схему лечения иммуномодуляторов отечественного производства.

**Результаты** отражают высокий уровень удовлетворенности пациентов, получающих терапию препаратами «Рефнот®» и «Ингарон®», качеством жизни. Данные подтверждаются оценками пациентов таких индикаторов, как хорошая переносимость и низкая токсичность препаратов, сохранение физической и социальной активности, удобство и психологический комфорт приема, ценовое преимущество.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют об удовлетворенности пациентов результатами терапии и сохранении оптимального уровня качества жизни, что позволяет сделать вывод о более широком применении отечественных цитокинов «Рефнот®» и «Ингарон®» в онкологической практике.

*В.Д. Румянцева<sup>1</sup>, Ю.В. Алексеев<sup>2</sup>, Н.М. Шумилова<sup>2</sup>, Г.В. Пономарев<sup>1</sup>, А.Е. Щелкунова<sup>1</sup>*

### **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ**

<sup>1</sup>МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА», Москва

**Цель исследования.** Разработать фармацевтические композиции (ФК) на основе иттербиевых металлокомплексов порфиринов (ИКП), обладающих способностью накапливаться в очагах воспаления и пролиферации при различных кожных заболеваниях. Оценить их перспективы для применения в клинической практике.

**Материалы и методы.** Препарат №1: 0,05% раствор амфифильного комплекса Yb-2,4-диметоксигематопорфирина IX в кремофоре (гелеобразователь) с добавлением глицерина. Препарат № 2: 0,05% раствор амфифильного комплекса Yb-2,4-диметоксигематопорфирина IX кремофоре (гелеобразователь) с добавлением глицерина и титаноглицеросольвата аквакомплекса («Тизоль») в соотношении 9:1 (компоненты разработаны для клинического применения). Макетный вариант лазерно-волоконного флуориметра (ЛВФ) разработки ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН (диапазон измерения 975-985 нм). Волонтеры (больные с розацеа, acne vulgaris, гемангиомами, кератомами, лазерными ожогами после удаления новообразований кожи, здоровые волонтеры в возрасте от 30 до 70 лет).

**Результаты.** Разработаны фармацевтические композиции с ИКП для применения у дерматологических больных в виде гелей. Выявлено, что однократное нанесение их в небольшом количестве на очаги поражения кожи при воспалительных процессах инфекционного и неинфекционного происхождения, а также некоторых новообразованиях и определение интенсивности флуоресценции в ближнем ИК-диапазоне через оптимальное время (40 мин.), показывает существенную разницу (в несколько раз) по сравнению со здоровой кожей. В процессе лечения по мере уменьшения воспалительных явлений (отеки, гиперемия), заживления эрозий интенсивность флуоресценции соответственно снижается.

**Выводы.** Разработанные фармацевтические композиции позволяют обеспечить быстрое проникновение в кожу, особенно, при ее повреждении или изменении барьерных свойств. Набор клинического материала при изучении данных процессов при различных дерматологических заболеваниях позволяет надеяться не только на контроль за эффективностью проводимой терапии, как в дерматологии, так и в косметологии, но и на дифференциальную диагностику.

*В.Д. Румянцева<sup>1</sup>, Ю.В. Алексеев<sup>2</sup>, Г.В. Пономарев<sup>3</sup>, Л.В. Михалева<sup>2</sup>, А.С. Горшкова<sup>1</sup>,  
О.Н. Старостин<sup>2</sup>*

### **РАЗРАБОТКА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК**

<sup>1</sup>МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА», Москва

<sup>3</sup>ФГБУ «ИБМХ им. В.Н.Ореховича» РАМН, Москва

**Цель исследования.** Разработать фармацевтические композиции (ФК) на основе иттербиевых комплексов порфиринов (ИКП), обладающих способностью накапливаться в очагах воспаления и пролиферации при заболеваниях слизистых оболочек. Оценить их перспективы для применения в клинической практике.

**Материалы и методы.** Препарат: 0,05% раствор амфифильного комплекса Yb-2,4-диметоксигематопорфирина IX на основе калгеля (гель стоматологический: лидокаина гидрохлорид 3,3 мг и цетилпиридиния хлорид 1 мг в 1 г). Макетный вариант лазерно-волоконного флуориметра (ЛВФ) разработки ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН (диапазон измерения 900 – 1100 нм). Волонтеры (больные с вульвовагинитом, здоровые волонтеры).

**Результаты.** Разработана фармацевтическая композиция с ИКП для применения на слизистых оболочках в виде геля. Выявлено, что однократное ее нанесение в небольшом количестве на очаги поражения при воспалительных процессах и определение интенсивности флуоресценции в ближнем ИК-диапазоне через оптимальное время (40 мин.), показывает существенную разницу, в несколько раз, по сравнению со здоровыми участками. В процессе лечения по мере уменьшения воспалительных явлений (отеки, гиперемия), заживления эрозий интенсивность флуоресценции соответственно снижается.

**Выводы.** Разработанная фармацевтическая композиция позволяет обеспечить быстрое проникновение в слизистые, особенно при их повреждении. Набор клинического материала при изучении данных процессов при различных заболеваниях позволяет надеяться не только на контроль за эффективностью проводимой терапии, но и на дифференциальную диагностику у гинекологических больных, в стоматологии и при ЛОР-заболеваниях. Оценка эффективности композиции позволит определить ее место при различных нозологических формах.

*А.А. Русанов, О.Р. Мельников, А.С. Лапшин, Н.В. Казаков, А.В. Герасин, М.Г. Ковалев, А.Л. Акопов*

### ТАКТИКА ЭНДОСКОПИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ НЕОПЕРАБЕЛЬНОГО РАКА

*ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Министерства здравоохранения России, Санкт-Петербург*

**Актуальность.** Ежегодно более полумиллиона россиян заболевают раком, у 65 % он диагностируется в III – IV стадии.

**Цели исследования.** Разработать способы комбинированного эндоскопического лечения больных в комплексной терапии неоперабельного рака.

**Материалы и методы.** В ПСПбГМУ им. И.П. Павлова с 2008 г. наблюдались 173 больных раком III – IV стадии. Использовали оборудование “Olympus”, “Pentax”, “Милон Лазер”, “Endo-Flex”; отечественные фотосенсibilизаторы: “Радахлорин®”, “Фотодитазин®”. У 57 больных опухоли стенозировали просвет полого органа, что в 19 случаях потребовало неотложной реканализации одним из разработанных способов.

**Результаты.** Внедрен новый “Способ абляции образований, стенозирующих просвет полых органов. Патент № 2531974”, позволяющий использовать лазер в среде, не поддерживающей горение (N-19). 38 больным имплантировали непокрытый эндопротез, что позволило в динамике наблюдения проводить ФДТ и АПК (“Способ лечения центральных стенозирующих злокачественных опухолей трахеи и бронхов”, патент № 2533979). Все больные (N-173) получали ФДТ в импульсном режиме излучения лазера. Во всех наблюдениях в комплексную терапию входила ПХТ, таргетная, гормональная терапии. Лучевая терапия, в т.ч. брахитерапия, осуществлена 29 пациентам.

**Выводы.** Клиническое применение разработанных способов и методов лечения позволяет повысить эффективность радикальной и паллиативной терапии онкологических заболеваний III – IV стадии внутрипросветного рака.

*О.Ю. Рыбалкина<sup>1,2</sup>, Н.Н. Ермакова<sup>1</sup>, Т.Г. Разина<sup>1</sup>, Е.П. Зуева<sup>1,2</sup>, Е.Г. Скурихи<sup>1</sup>*

### СНИЖЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАНА

#### НА КОСТНОМОЗГОВОЕ КРОВОТЕВОРЕНИЕ

#### С ПОМОЩЬЮ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ (M=20-30 kDa)

#### У МЫШЕЙ С КАРЦИНОМОЙ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС

<sup>1</sup>НИИФ и РМ им. Е.Д. Гольдберга, Томск

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

**Цель исследования.** Изучение возможности коррекции токсического влияния циклофосфана на систему крови мышей с помощью альгината натрия с молекулярной массой 20 – 30 kDa.

**Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 86 мышцах-самках линии C57BL/6 с перевитой внутримышечно карциномой легких Льюис (LLC). Альгинат натрия использовали в дозе 100 мг/кг рег ос с 7 сут после перевивки LLC. Циклофосфан вводили на 10 сут развития опухоли в дозе 125 мг/кг. Показатели периферической крови и костного мозга определяли на 1, 3, 5, 7 сут после инъекции цитостатика стандартными гематологическими методами.

**Результаты.** В результате развития опухолевого процесса у мышей с LLC в периферической крови регистрировался лейкоцитоз, преимущественно, за счет сегментоядерных нейтрофилов. В костном мозге мышей с опухолью на протяжении всего эксперимента общее количество миелокариоцитов было ниже фонового значения, что свидетельствует об истощении костномозгового пула. Под влиянием альгината натрия в периферической крови мышей с LLC снижалась выраженность лейкоцитоза, возникающего в результате развития опухоли, при этом клеточность костного мозга у получавших альгинаты мышей не менялась, наблюдалось лишь перераспределение отдельных форм. На 3 сут после однократной инъекции циклофосфана в периферической крови мышей с опухолью отмечалась выраженная лейкопения. При использовании альгината натрия в схеме химиотерапии выше оказалось как общее количество лейкоцитов, так и сегментоядерных нейтрофилов (в 2,6 и 3 раза) относительно таковых показателей в группе монохимиотерапии. Аналогичные данные получены и на 7 сут после введения цитостатика. Следует отметить, что увеличение общего количества лейкоцитов было обусловлено повышенным содержанием сегментоядерных нейтрофилов. Также отмечено защитное действие альгината в отношении нейтрофильных гранулоцитов, о чем свидетельствовало повышенное число незрелых и зрелых нейтрофильных гранулоцитов в костном мозге мышей на 1 сут после введения циклофосфана.

**Выводы.** Таким образом, назначение альгината натрия с молекулярной массой 20 – 30 kDa животным с LLC препятствует опустошению костного мозга и приводит к стимуляции процесса регенерации гранулоцитарного ростка кроветворения, поврежденного однократным введением цитостатика.



О.О. Рябая<sup>1,2</sup>, Т.А. Сидорова<sup>1</sup>, А.Н. Иншаков<sup>1</sup>, Ю.А. Хоченкова<sup>1</sup>, Е.В. Степанова<sup>1</sup>

### БЛОКИРОВАНИЕ АУТОФАГИИ КАК НОВЫЙ ПОДХОД В ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

**Актуальность.** Модуляция аутофагии рассматривается как новый перспективный подход к химиотерапии различных новообразований. В настоящее время разрабатываются экспериментальные основы ее использования для лечения меланомы в клинической практике.

**Цель исследования.** Оценить значимость ингибирования аутофагии хлорокином *in vitro* для повышения цитотоксичности паклитаксела на клеточных линиях метастатической меланомы (ММ) с разным статусом гена *B-RAF*.

**Материалы и методы.** В работе были использованы 11 клеточных линий ММ, полученных от пациентов. Цитотоксичность определяли МТТ-тестом, клеточную гибель – проточной цитометрией. Детекцию экспрессии мРНК *Beclin1* проводили методом ОТ-ПЦР, а его белка – вестерн-блоттингом. Для блокирования белка *Beclin1* использовали метод трансфекции. Активацию аутофагии определяли иммуноцитохимически антителами к LC3B.

**Результаты.** Мутации в гене *B-RAF* определяют уровень аутофагии в клетках ММ *in vitro*: базальный уровень в клетках *B-RAF<sup>V600</sup>(mt)* был выше, чем в *B-RAF<sup>wt</sup>(wt)*. *Mt*-линии были резистентны к действию паклитаксела, а ингибирование аутофагии хлорокином увеличивала цитотоксичность на 40 – 50 %. Хотя *wt*-клетки ММ были более чувствительны к паклитакселу, добавление ингибитора не влияло на гибель клеток. Блокирование *Beclin1* также показало увеличение цитотоксического эффекта у *mt*-клеток, но не влияло на *wt*-клетки. Изучение механизмов феномена показало вовлечение апоптоза.

**Выводы.** Комбинация паклитаксела и хлорокина является перспективным режимом терапии ММ у пациентов с *B-RAF<sup>V600</sup>*. Эффективные комбинации требуют дальнейшего изучения.

А.В. Савинкова<sup>1</sup>, О.И. Задорожная<sup>1</sup>, Л.Р. Тилова<sup>1</sup>, К.И. Курсанов<sup>1</sup>, А.М. Оглоблина<sup>1</sup>, Г.А. Белицкий<sup>1</sup>, И.В. Будунцова<sup>2</sup>, М.Г. Якубовская<sup>1</sup>, Е.А. Лесовая<sup>1</sup>

### СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНАНТИОМЕРОВ CPdA IN VITRO

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>Northwestern University, Chicago, USA

**Актуальность.** Глюкокортикоиды (GC) являются важным компонентом химиотерапии гемобластозов. Терапевтическое действие GC реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR) по механизму транс-репрессии, развитие побочных эффектов связано с транс-активацией. Ранее нами было показано, что соединение класса селективных агонистов GR, CpдA, избирательно запускает транс-репрессию. CpдA представляет собой смесь двух энантиомеров, которые могут по-разному взаимодействовать с GR. Нами были впервые синтезированы энантиомеры CpдA, проведена оценка их цитотоксического действия по сравнению с рацематом, и их лигандных свойств.

**Материалы и методы.** Синтез энантиомеров был осуществлен на основании дигидроксилирования алкенов по Шарплессу; цитотоксический эффект определяли путем подсчета клеток. Лигандные свойства оценивали путем ПЦР-анализа экспрессии GR-зависимых и NF-kB-зависимых генов.

**Результаты и выводы.** Впервые синтезированы энантиомеры CpдA и показано, что их цитотоксический эффект сопоставим с цитотоксическим эффектом рацемата. Продемонстрировано, что S-энантиомер не вызывает транс-активации GR-зависимых генов или подавляет их экспрессию. Влияние энантиомеров на экспрессию генов CCND1 и CCND2 было неоднозначным.

*А.Г. Сандалевская, Б.А. Минько, Р.М. Жабина, А.В. Мешечкин, В.Г. Красникова*

### **ВОЗМОЖНОСТИ СОНОГРАФИИ**

### **В ОЦЕНКЕ ЛОКОРЕГИОНАЛЬНЫХ РЕЦИДИВОВ РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ**

### **И МОНИТОРИНГЕ НЕПОСРЕДСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ**

*ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург*

**Задачи исследования.** Изучение возможностей ультразвукового метода в исследовании больных с локорегиональными рецидивами рака прямой кишки и оценка результатов химиолучевой терапии.

**Материалы и методы.** Обследовано 13 пациентов с рецидивом рака прямой кишки, получавших химиолучевую терапию. Средний возраст больных 68 лет. Во всех случаях гистологическая форма опухоли была представлена аденокарциномой разной степени дифференцировки. Было проведено 20 ультразвуковых исследований различных локализаций локорегиональных рецидивов колоректального рака. Обследование выполнялось при поступлении в стационар и в конце первого этапа химиолучевой терапии на УЗ-системе «Aixplorer» в В-режиме с использованием гипогастрального, перенеального и внутриволокнистого доступов. Оценивалась локализация образования, его размеры и контуры. Отмечали эхо-признаки инвазии в окружающие ткани, продолженного роста и изменения региональных лимфоузлов. Жесткостные характеристики образования оценивали методом эластографии сдвиговой волны. Для исключения отдаленных метастазов всем больным проводили ультразвуковое обследование органов брюшной полости.

**Результаты.** Локализация рецидивов непосредственно в зоне операции (анастомоз, ложе удаленной кишки) была выявлена у 2 пациентов, в клетчатке малого таза – у 9, в мягких тканях – у 2. Наименьший оцениваемый нами рецидив – локальное узловое образование в анастомозе после резекции прямой кишки размером 17мм, наибольший – рецидив в малом тазу размером 60×30 мм. При эластографии во всех случаях получали картирование красном цветом, что соответствовало высокой жесткости образования по сравнению с окружающими тканями. Цифровые значения плотности имели значительный разброс от 50 до 180 кПа. У всех больных, у которых патологический процесс затрагивал стенки кишки отмечались эхо-признаки злокачественного процесса – снижение эхогенности и утолщение стенок кишки до нарушения слоистой структуры стенок, сужение просвета. При УЗИ после проведенного химиолучевого лечения отмечалось уменьшение размеров образования (на 3 – 5 мм) и более отчетливая визуализация, что расценивалось как эхо-признаки локализации процесса и проявление положительной динамики. Сохранялись снижение эхогенности, безструктурность и утолщение стенки кишки (что расценивается нами как постлучевые изменения), но контуры становились более четкими, отграниченными от окружающих тканей.

**Вывод.** Сонография является эффективным методом диагностики рецидивов рака прямой кишки и позволяет оценить результаты химиолучевого лечения.

*М.С. Саяпина, А.А. Борунова, Д.А. Носов*

### **СОДЕРЖАНИЕ CD4+CD25+ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ**

### **И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ ИНТЕРФЕРОНОМ-АЛЬФА**

### **У БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ**

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Терапия интерфероном-альфа (ИНФ) остается возможной лечебной опцией у больных метастатическим почечно-клеточным раком (мПКР) с благоприятным прогнозом.

**Цель исследования.** Определить эффективность и переносимость ИНФ. Изучить динамику субпопуляции CD4+CD25+ лимфоцитов и ее связь с эффективностью терапии ИНФ.

**Материалы и методы.** В период с 2011 по 2014 г. 38 пациентов мПКР получали лечение ИНФ. У 30 пациентов терапия проводилась в 1 линии, у 8 – во 2 и более. Оценка иммунологических параметров осуществлялась в течение 1 недели до начала иммунотерапии, через 2 недели после начала и через 8 недель в период контрольного обследования. Иммунофенотип лимфоцитов оценивали методом многоцветной проточной цитометрии с использованием антител, в том числе к CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD25.

**Результаты.** В группе из 30 больных, получавших ИНФ в первой линии, у 5 (16,6 %) зафиксированы частичные регрессии, у 21 (70 %) пациента наблюдались длительные стабилизации опухолевого процесса (>6мес). В группе из 8 пациентов, ранее леченных, у 3 пациентов (37,5 %) отмечена частичная регрессия. У 9 (23,7 %) пациентов отмечено прогрессирование. Медиана времени до прогрессирования составила 7,5 (2-12+) мес. У больных с частичным эффектом исходное содержание CD4+CD25+ популяции Т-лимфоцитов было практически в пределах донорских показателей (3,5±2,1 %) и составляло 4,4 %, у больных с прогрессированием исходное содержание этой субпопуляции клеток было в 3 раза выше – 12,1 %. При этом следует отметить тенденцию к снижению данной субпопуляции на фоне лечения в группе с клиническим эффектом.

**Выводы.** Исходно повышенное содержание субпопуляции CD4+CD25+ лимфоцитов в периферической крови больных может являться отрицательным прогностическим фактором иммунотерапии ИНФ. Вероятнее всего за счет иммунорегуляторной субпопуляции CD4+CD25+Foxp3+CD127<sup>low</sup>-Т-клеток (T-reg). Целесообразно дальнейшее исследование данной субпопуляции Т-клеток как потенциального маркера эффективности иммунотерапевтического подхода.

*А.В. Сергеев<sup>1</sup>, Т.А. Алиева<sup>1</sup>, Ю.М. Букреев<sup>1</sup>, И.М. Лученко<sup>1</sup>, В.В. Решетникова<sup>1</sup>, Н.Ю. Соколов<sup>2</sup>, И.Ж. Шубина<sup>1</sup>*

### МЕСТО РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И КАРОТИНОИДОВ В ХИМИОПРОФИЛАКТИКЕ РАКА

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>ФГУ ГВКГ ИМ. Н.Н. БУРДЕНКО, МОСКВА

**Актуальность.** Растительные полисахариды (ПС) в отличие от каротиноидов (КР) недостаточно изучены в качестве потенциальных средств химиопрофилактики рака (ХПР).

**Цель исследования.** Сравнительное изучение иммуномодулирующей, антиканцерогенной и антимутагенной активности ПС и КР.

**Материалы и методы.** ПС из сабельника болотного, тагетаса гибридного и свербиги восточной получены последовательной водно-спиртовой экстракцией и химически охарактеризованы. Препарат бета-каротина (БК) и БК-содержащий препарат «Каскатол» (КСК) разрешены для использования в аптечной сети. Методы оценки иммуномодулирующей, антиканцерогенной и антимутагенной активности описаны нами ранее.

**Результаты.** Все ПС при систематическом введении мышам BALB/c в течение 2 – 6 недель стимулировали в 2 – 4 раза пролиферативную активность спленоцитов и цитолитическую активность Т-киллеров и перитонеальных макрофагов. БК и КСК были более эффективны, чем ПС, в стимуляции гуморального звена иммунитета. БК и КСК обладали более выраженным антиканцерогенным и антимутагенным эффектом по сравнению с ПС. БК и КСК уменьшали на 30 – 40 % число опухолей печени и ЖКТ, индуцированных химическими канцерогенами, удлиняли латентный период появления опухолей и продолжительность жизни животных. БК и КСК снижали на 30 – 40 % число хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей и крыс, индуцированных у животных цитостатиком или канцерогеном. БК и КСК обладали антиоксидантным и антиоксидическим действием, что проявлялось в снижении концентрации малонового диальдегида, повышении активности супероксид-дисмутазы и концентрации тиоловых групп в плазме крови и ткани печени.

**Выводы.** Совместное применение ПС и КР может рассматриваться как перспективное потенциальное средство химиопрофилактики рака (Cancer chemoprevention).

*Т.В. Сергеева<sup>1,2</sup>, Е.В. Жаров<sup>1,2</sup>, О.П. Богатырев<sup>3</sup>, А.В. Иванов<sup>4</sup>,*

*С.В. Зиновьев<sup>4</sup>, О.И. Койфман<sup>5</sup>, А.А. Красновский<sup>6</sup>*

### ЛОКАЛЬНАЯ ФОТОДИНАМИКА ДЛЯ СНИЖЕНИЯ АГРЕССИИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

<sup>1</sup>ООО «ЦВМ», Москва

<sup>2</sup>ЦКБ РАН, Москва

<sup>3</sup>МОНИКИ, Москва

<sup>4</sup>ФГБНУ «РОИЦ им.Н.Н. Блохина», Москва

<sup>5</sup>ИГХТУ, Иваново

<sup>6</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

**Цель исследования.** Изучение свойств нового фотосенсибилизатора (ФС) бактериохлоринового ряда с поглощением в полосе поглощения эндогенного молекулярного кислорода 762 нм.

**Задачи исследования.** Оценить эффективность использования локальной фотодинамики и особенности механизма фотодинамического ответа.

**Материалы и методы.** На моделях первичных культур из клеток рака щитовидной и молочной желез человека в трёхмерной конструкции изучены эффекты воздействия лазерного излучения 762 нм. Результаты оценивались с помощью световой и флуоресцентной микроскопии, иммуноцитохимических методов. Использовали антитела против кератинов, виментина, белков теплового шока, фактора некроза опухоли  $\alpha$ , фактора роста эндотелия сосудов, маркера пролиферации Ki-67. Использованы модели животных с лимфомой, опухолью Льюиса, спонтанным раком щитовидной и молочной желез. ФС вводился интратуморально из расчета 5 – 15 мг на 1 г опухолевой ткани, что позволяло повысить его локальную концентрацию более чем в 1000 раз и минимизировать концентрацию ФС в крови. Воздействие лазерным излучением 762 нм проводилось интерстициально непосредственно в опухоли дозами 100 – 200 Дж/г опухоли.

**Результаты.** Подтверждён несенсибилизированный фотоотклик при облучении в полосе поглощения кислорода. Сильное поглощение в ближнем ИК диапазоне 760 – 762 нм определяет быстрое и эффективное возбуждение ФС с высоким квантовым выходом синглетного кислорода. Изучен фотодинамический эффект с использованием предложенной формы бактериохлорина. Положительный эффект отмечен в различных по морфологии опухолях. Обнаружена закономерность перестройки опухоли – понижение ее злокачественного потенциала, повышение дифференцировки, снижение темпа роста и метастазирования. Уменьшение объёма опухоли происходило за счёт реакции апоптоза, некроза опухоли не отмечали. Результаты проведенных исследований убеждают в целесообразности локальной фотодинамики новым красителем бактериохлоринового ряда как способа адьювантной терапии, универсального для любого морфологического типа опухоли.

*В.Ю. Сергеев*

### **КЛИНИКО-ДЕРМАТОСКОПИЧЕСКИЕ ПАТТЕРНЫ В ДИАГНОСТИКЕ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ**

*РОО «Общество дерматоскопии и оптической диагностики кожи», Москва*

Базальноклеточный рак кожи (БКР) – ведущее по частоте выявляемости дерматоонкологическое заболевание. На современном этапе актуальны такие вопросы как ранняя доклиническая диагностика, определение длительности наблюдения, периодичности осмотров, разработки программ ранней диагностики рецидивов, а также выявление факторов риска возникновения БКР.

В формировании групп повышенного онкологического риска в настоящее время принципиально важным является внедрение методов видеодерматоскопии, позволяющей проводить раннюю доклиническую диагностику эпителиальных опухолей. В настоящее время для диагностики базально-клеточного рака внедрена отечественная система РДС-1 с поляризованным и ультрафиолетовыми осветительными блоками. Метод дерматоскопии достаточно широко внедрен онкологами и дерматологами для диагностики пигментных образований.

Видеодерматоскопия значительно расширяет возможности диагностики, лечения, а главное профилактики заболеваний кожи, особенно опухолевых образований, что делает необходимым ее широкое внедрение в повседневную практическую деятельность врачей-дерматологов. Среди основных видеодерматоскопических критериев БКР, следует указать на наличие признаков ангиогенеза и мелких узелков («жемчужных папул»), выявляющихся при 80 кратном увеличении, невидимых невооруженным глазом. Кроме того, мы впервые обнаружили несколько клинико-цитологических исследований данных мазков во всех случаях подтвердили диагноз базалиомы. Таким образом, новый метод видеодерматоскопического изучения цитологического мазка позволяет, помимо клинических характеристик, дополнительно, непосредственно на приеме подтверждать диагноз базалиомы, фиксировать данные в памяти компьютера и, при необходимости, пересылать его цитологам для дополнительного изучения и сравнения с классическим цитологическим методом.

Внедрение метода видеодерматоскопии при осмотре кожи и цитологических мазков при подозрении на БКР совершенствуют раннюю диагностику и мероприятия первичной и вторичной профилактики рака кожи.

*Ю.Ю. Сергеев, В.Ю. Сергеев*

### **СОВЕРШЕНСТВУЯ ДИАГНОСТИКУ МЕЛАНОМЫ: ТЕЛЕДЕРМАТОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СПЛОШНОЙ СЕРИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ**

*РОО Дерматоскопии и оптической диагностики кожи, Москва*

Наряду с изучением иммунопатогенеза и поиском новых возможностей биотерапии опухолей кожи, значительный прогресс в борьбе с меланомой достигнут в области ранней диагностики с использованием сканирующих устройств и дерматоскопии. Цифровая дерматоскопия получает все большее распространение в последнее время в связи с развитием медицинской техники и появлением различных устройств, облегчающих соединение ручных дерматоскопов с различными фотоаппаратами [3, 4]. Возможность фиксации дерматоскопического изображения позволяет врачу не только проводить динамическое наблюдение за образованиями, но и использовать преимущества телемедицины: получать мнение эксперта в короткие сроки без временных и экономических затрат для пациента. С целью определения возможности постановки диагноза или выбора тактики ведения пациента только по дерматоскопической картине нами были отобраны в случайном порядке 100 изображений, полученных при помощи дерматоскопа РДС-1 и загруженных на удаленный сервер автоматизированной диагностики меланоцитарных образований в сплошном порядке в течение 2014-2015 гг. Для включения изображения в исследование предъявлялось два условия: 1) образование по диаметру не превышает поле зрения дерматоскопа; 2) не нарушена методика проведения дерматоскопического осмотра. Отобранные изображения анализировались при помощи двухшагового алгоритма, меланоцитарные образования обрабатывались 7-балльным алгоритмом Argenziano. Из 100 образований 69 имели меланоцитарную природу, 30 образований немеланоцитарную, дерматоскопическая картина 1 образования была неспецифической. Из 69 меланоцитарных образований 51 (73,9%) набрали по 7-балльной шкале алгоритма 0 баллов, 16 (23,2%) набрали от 1 до 3 баллов, 2 (2,9%) образования имели предположительно акральную локализацию и не были обработаны. Среди немеланоцитарных образований 25 (83,4%) были диагностированы как себорейный кератоз, 4 (13,3%) образования имели сосудистое происхождение (ангиокератомы, гемангиома), 1 образование было представлено открытым комедоном. Исходя из полученных данных, гистологическое исследование для уточнения диагноза, в связи с наличием вероятных дерматоскопических признаков меланомы, можно рекомендовать в 17 случаях из 100. Большинство новообразований кожи имеют характерную дерматоскопическую картину, что позволяет ставить диагноз и выбирать тактику ведения пациента по фотографии. В небольшой части случаев может потребоваться дополнительная информация о пациенте: анамнез, возраст, фототип кожи по Фитцпатрику, клиническая картина исследуемого образования и др. Обязательными условиями удаленной оценки является хорошее качество дерматоскопического изображения, отсутствие артефактов (дефекты нанесения иммерсионной среды, нитки, волосы) в поле осмотра и правильный выбор образований для представления на телеконсультацию. Удаленная оценка дерматоскопических изображений – перспективное направление развития дерматоскопии в России, требующее дальнейшего изучения и развития.

*В.Б. Сирота, Н.А. Кабилдина, И.М. Омарова, М.Д. Жумакаев, Д.Д. Дороган, Е.А. Досманова*

**ПАТОМОРФОЗ ОПУХОЛИ ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***КГМУ, КГП «ООД», Караганда, Казахстан*

**Цель исследования.** Провести оценку лекарственного патоморфоза опухоли при химиотерапии рака молочной железы.

**Материалы и методы.** В исследование включены 76 больных раком молочной железы ( $T_2N_{1-2}M_0$ ,  $T_3N_{0-2}M_0$ ) в возрасте от 28 до 75 лет. В контрольной группе 30 больным проводили 4 курса неоадьювантной ХТ по схеме АС (доксорубин 50 мг/м<sup>2</sup>, циклофосфан 500 мг/м<sup>2</sup>), исследуемая группа 1 (26 человек) получала режим ХТ АС в сочетании с арглабином (арглабин 370 мг/м<sup>2</sup> № 7 дней), исследуемая группа 2 (20 больных) – монотерапию арглабином. Использована классификация лучевого патоморфоза рака по Г.А. Лавниковой (1979).

**Результаты.** Частичный ответ опухоли в исследуемой группе 1 – 61,5±9,5 %, в исследуемой группе 2 – 30,0±10,2 % ( $p \leq 0,05$ ). Не было статистической разницы в патоморфозе опухоли 3 – 4 степени у больных всех трех групп. Патоморфоз опухоли 3 – 4 степени в контрольной группе составил 33,3±8,6 %, в исследуемой группе 1 – 34,6±9,3 %, в исследуемой группе 2 – 20,0±8,9 %. Не было достоверной зависимости патоморфоза опухоли от иммуногистохимического фенотипа рака и величины опухолевого узла.

**Выводы.** Необходимо продолжить дальнейшее исследование лекарственного патоморфоза у пациентов, получающих арглабин.

*Д.Ю. Скляр, И.В. Назимов, М.С. Вагида, А.Т. Градюшко***БИООРГАНИЧЕСКИЕ ДЕНДРИМЕРЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ***ФГУН ИБХ им академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

Присоединение природного порфирина – хлорина к мультиплетному пептиду, содержащему последовательность RGDS и фолиевую кислоту, позволило сохранить спектральные характеристики хромофора и тропность пептида контактного взаимодействия к рецепторам. Реакционноспособные группы в модифицированных пептидах и боковые функциональные группы в порфиринах служат источником связей для образования из них порфиринов и дендримеров. При синтезе порфираза меди в масс-спектрах, помимо ожидаемого продукта (ММ – 692<sup>+</sup>), наблюдался пик ММ – 529<sup>+</sup>, соответствующий порфрину меди. Широкий спектр флуоресценции мультиплетных производных порфираза цинка (400 – 900 нм) позволил наблюдать связывание этих соединений с клеточными линиями методом проточной цито флуориметрии с различными источниками возбуждения. Необычным свойством получаемых дендримеров является способность образовывать суспензию nano частиц с очень узким распределением по размерам. Наличие реакционных групп позволяет осуществлять присоединение разных лигандов вплоть до моноклональных антител, что в сочетании с синтезом библиотек, возможно, позволит таргетировать злокачественные новообразования персонализировано. Маркировка фрагментов пептидной цепи может быть проведена реакцией диазотирования. Комплексообразование с внешними группами порфиразинов и их дендримеров может приводить к наночастицам с большим содержанием металла, по всей видимости перспективным и для термотерапии учитывая поглощение ближнего ИК- излучения и сорбцию на тканях этих соединений.

*Е.Г. Славина, А.И. Черткова, Л.Г. Жукова, И.П. Ганьшина, М.А. Окружнова, Э.К. Шоуа, В.А. Нуртдинова, А.А. Борунова, З.Г. Кадагидзе***РАЗЛИЧИЯ В ПОПУЛЯЦИОННОМ СОСТАВЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С HER-2-ПОЗИТИВНЫМ И ТРИЖДЫ НЕГАТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее частым вариантом злокачественных опухолей у женщин во всем мире. Для РМЖ характерна клиническая и молекулярная гетерогенность. У 20 – 30 % больных определяется гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER2<sup>+</sup> РМЖ), а в 10 – 20 % случаев диагностируется трижды-негативный РМЖ (Т-Н РМЖ), который характеризуется отсутствием рецепторов к эстрогену и прогестерону, а также отсутствием гиперэкспрессии HER2.

**Цель исследования.** В настоящей работе у больных HER2<sup>+</sup> РМЖ и Т-Н РМЖ определяли связь между исходным количеством основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови (ПК) и результатами проведенной терапии.

**Материалы и методы.** В исследование были включены пациентки с HER2-положительным (n=24) и Трижды-негативным (n=31) РМЖ с местно-распространенными, первично-неоперабельными формами, с изолированными метастазами в л/у и висцеральные органы. Контролем служили здоровые женщины (n=28). Иммунологическое обследование больных проводилось до начала лечения. Оно заключалось в иммунофенотипировании лимфоцитов (ПК) и определении цитотоксической (ЦТ) активности NK-клеток.

**Результаты и выводы.** У больных HER2<sup>+</sup> РМЖ с высокой степенью патоморфоза опухоли до лечения выявляется повышение количества регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с пациентками с низкой степенью патоморфоза и с контролем. У больных HER2<sup>+</sup> РМЖ и Т-Н РМЖ с высокой степенью патоморфоза опухоли до лечения определяется уменьшение величины соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-клеток. Для больных Т-Н РМЖ с высокой степенью патоморфоза характерно повышение цитотоксической активности естественных киллеров до лечения по сравнению с больными с низкой степенью патоморфоза и со здоровыми женщинами.

*Г.Б. Смирнова, Ю.А. Борисова, М.С. Калишьян, Е.М. Трещалина, Н.А. Оборотова, М.А. Барышникова*

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО НИТРОЗОПРОИЗВОДНОГО ОРМУСТИНА С МЮСТОФОРАНОМ НА ПОДКОЖНЫХ КСЕНОГРАФТАХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА MEL7

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва, Россия

**Актуальность.** Новый препарат ормустин из группы нитрозопроизводных алкилирующих цитостатиков с карбамилирующим действием проходит доклиническое изучение на опухолях человека в качестве нового противоопухолевого средства в сравнении с клиническим прототипом мюстофораном, эффективным при лечении диссеминированной меланомы.

**Цель исследования.** Оценить сравнительную эффективность ормустина и мюстофорана на подкожных ксенографтах меланомы человека под контролем переносимости.

**Материалы и методы.** Использованы подкожные ксенографты перевиваемой беспигментной меланомы Mel7 (Bro) на мышцах-самках Balb/c nude (n=27), чувствительной к нитрозопроизводным (по данным РОНЦ). В опыте 4 группы. Препараты вводили мышам в/в (n=9), лиофилизат ормустина (лаб. хим.фарм анализа) – в 5% глюкозе на 9 сутки после трансплантации опухоли в однократных дозах 110 или 125 мг/кг. Мюстофоран («les Lab. Servier» Франция) в разовой дозе 25 мг/кг вводили мышам в оригинальном растворителе на 9 и 13 сутки. Контроль роста опухоли выполнен в динамике, мыши (n=6) получали растворители в адекватной схеме. Эффективность оценена по стандартному показателю в сравнении с контролем ( $T/C_{max} \leq 42\%$ ). Достоверность полученных данных рассчитана с помощью компьютерной программы Excel для Windows 2010.

**Результаты.** Ормустин в обеих примененных дозах показал достоверный противоопухолевый эффект на уровне  $T/C=42-43\%$  ( $p<0,05$ ) на 15 сутки после лечения. Мюстофоран был достоверно эффективен на 10 сутки на уровне  $T/C=41\%$  ( $p<0,05$ ) после 2-кратного курса. Достоверных различий между группами нет. Переносимость лечения обоими препаратами была удовлетворительной.

**Заключение.** Полученные данные позволяют считать ормустин и мюстофоран равноэффективными на подкожных ксенографтах меланомы человека Mel7 по уровню достоверного противоопухолевого эффекта и переносимости лечения.

З.С. Смирнова<sup>1</sup>, Л.М. Борисова<sup>1</sup>, М.П. Киселева<sup>1</sup>, А.В. Ланцова<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1</sup>, В.Я. Чалей<sup>1</sup>, В.В. Мусияк<sup>2</sup>, Т.В. Матвеева<sup>2</sup>, Г.Л. Левит<sup>2</sup>, В.П. Краснов<sup>2</sup>, М.А. Барышникова<sup>1</sup>, А.Ю. Барышников<sup>1</sup>

### ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОРМУСТИНА, НОВОГО ПРЕПАРАТА КЛАССА АЛКИЛНИТРОЗОМОЧЕВИН, В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ

<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>2</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

**Актуальность.** ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» и Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН проводят совместные исследования нового отечественного противоопухолевого препарата ормустин из класса алкилнитрозомочевин (АНМ). АНМ широко используются в клинической практике, они обладают высокой противоопухолевой активностью и широким спектром противоопухолевого действия, особенно в комбинациях с другими противоопухолевыми средствами.

**Цель исследования.** Изучить противоопухолевую активность ормустина на перевиваемых опухолях мышей.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на иммунокомпетентных мышках-самках и мышках-самцах линий C57Bl/6j, DBA/2 и CBA и гибридах первого поколения BDF<sub>1</sub> (C<sub>57</sub>Bl/6j×DBA/2) массой тела 18-22 г. Для оценки противоопухолевой активности использовали следующие перевиваемые опухоли: лимфоцитарная лейкемия P-388, лимфоидная лейкемия L-1210, эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC), рак шейки матки РШМ-5, меланома B-16. Была определена терапевтическая доза ормустина, которая составляет 125 мг/кг. Оценку противоопухолевой эффективности ормустина на разных моделях опухолей проводили при однократном внутривенном введении в терапевтической дозе. Для оценки противоопухолевого эффекта использовали следующие критерии: торможение роста опухоли (ТРО, %), увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) экспериментальных мышей по сравнению с контрольными животными и излечение (%).

**Результаты.** Проведенные исследования ормустина, нитрозоуреидопроизводного диаминокарбоновой кислоты L-орнитина, выявили высокую противоопухолевую активность препарата. Установлено, что ормустин в терапевтической дозе 125 мг/кг при однократном внутривенном введении вызывает излечение мышей с лейкозами в большом проценте случаев. На P-388 Ормустин вызывает излечение мышей в 50 % случаев, а УПЖ оставшихся животных составляет 174 %. На L-1210 Ормустин вызывает излечение мышей в 66,7 % случаев, а УПЖ оставшихся животных составляет 346 %. На РШМ-5 препарат в дозе 125 мг/кг при однократном внутривенном введении вызывает излечение всех мышей в опытной группе. Ормустин также оказывает высокий терапевтический эффект на меланому B-16 и LLC. ТРО на меланоме B-16 составляет от 99,3 % до 91 % в течение 15 дней (УПЖ 84 %), а на LLC от 99,9 % до 87 % в течение 14 дней (УПЖ 84 %).

**Заключение.** Полученные результаты дают основание продолжить исследования ормустина по изучению его перекрестной устойчивости с другими препаратами из класса АНМ, а также при комбинированной терапии опухолей с целью повышения эффективности лечения онкологических больных.

З.С. Смирнова<sup>1</sup>, Л.М. Борисова<sup>1</sup>, М.П. Киселева<sup>1</sup>, А.А. Осипова<sup>1,2</sup>, В.Н. Осипов<sup>1,2</sup>, А.В. Колотаев<sup>2</sup>, Д.С. Хачатрян<sup>2</sup>

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО СОЕДИНЕНИЯ ИЗ КЛАССА ПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗОЛА D04607**<sup>1</sup>ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва<sup>2</sup>ФГУП «ИРЕА», Москва

**Цель исследования.** Оценка противоопухолевой активности нового соединения из класса производных имидазола D04607 на перевиваемых опухолях мышей.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на иммунокомпетентных самках и самцах мышей линий C57Bl/6j и DBA/2 (доноры опухолевого материала) и гибридах первого поколения BDF<sub>1</sub> (C<sub>57</sub>Bl/6j x DBA/2) массой тела 20 – 25 г. Мышей делили на группы по 10 – 12 особей в контрольной группе, по 3 – 5 мышей в группах с асцитной опухолью – лимфоцитарной лейкемией P-388 и по 8 особей в группах с солидными опухолями – меланомой B-16 и эпидермоидной карциномой легкого Льюис (LLC). Опухоли перевивали лабораторным животным по стандартной методике. Соединение D04607 растворяли в дистиллированной воде и вводили внутрибрюшинно в диапазоне доз от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг ежедневно в течение 5 дней. Критериями оценки противоопухолевой активности служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни подопытных мышей по сравнению с контрольными животными (УПЖ, %). Минимальными критериями эффективности соединений служат: ТРО ≥ 50% и УПЖ ≥ 25%.

**Результаты.** В результате проведенных исследований показано, что на P-388 соединение D04607 уже в дозе 10 мг/кг при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение 5 дней вызывало гибель 2 мышей из 3 животных в группе, а остальные дозы: 25 мг/кг, 50 мг/кг, 75 мг и 100 мг/кг были летальными. При этом соединение D04607 вызывало УПЖ равное 14%, 9% и 14% в дозах 7 мг/кг, 5 мг/кг и 3 мг/кг соответственно. Однако это значение УПЖ ниже минимального критерия эффективности соединения. На меланоме B-16 соединение D04607 проявляло слабый, но статистически значимый противоопухолевый эффект только в дозе 5 мг/кг в течение 4 дней: ТРО = 55 – 56 %, которое соответствует минимальному критерию эффективности для новых веществ. На LLC соединение D04607 в дозе 3 мг/кг тормозило рост этой опухоли на 72 % непосредственно после окончания лечения мышей.

**Заключение.** Результаты по противоопухолевой активности соединения D04607 позволяют продолжить исследования вещества на других моделях опухолей и/или при других режимах введения, а также при комбинированной терапии опухолей с целью повышения эффективности лечения онкологических больных.

*А.В. Соколовский, В.А. Соколовский***АСЕПТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МЕГАПРОТЕЗА КОЛЕННОГО СУСТАВА ПРИ РЕЗЕКЦИИ БЕДРЕННОЙ И БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ: АНАЛИЗ ОТДАЛЁННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ.***ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Несмотря на значительное увеличение срока службы эндопротезов коленного сустава, в настоящее время, актуальность проблемы асептической нестабильности после онкологической резекции этой области не снижается.

**Цель исследования.** Выявить основные причины асептической нестабильности имплантатов, частоту и вероятность повторных операций.

**Материалы и методы.** С 1992 по 2014 г. 538 пациентам было выполнено 357 первичных и ревизионных операций области коленного сустава, что составило 58 % от общего количества произведённых операций. За период 22 лет было выполнено 66 ревизионных операции причиной, которых стала асептическая нестабильность. После резекции дистального отдела бедренной кости было выполнено 40 и после резекции проксимального отдела большеберцовой кости 26 ревизионных операций. Повторные операции после резекции дистального отдела бедренной кости были выполнены 9 пациентам и после резекции проксимального отдела 6. Одному пациенту выполнено 5 повторных ревизий. Средний период наблюдений составил 61,5 месяца (медиана 47,7; от , 0,1 до 252,1 месяцев).

**Результаты.** Срок службы эндопротеза коленного сустава после резекции бедренной кости в течение 5 и 10 лет составил 70,3 % и 53,9 %, после резекции большеберцовой кости 55,8 % и 26,8 %. Частота асептической нестабильности составила 14,6 %. Основным осложнением асептической нестабильности стала поломка ножки эндопротеза. Сроки возникновения асептической нестабильности в нашем исследовании варьировали от 0,47 до 124,7 месяцев и среднем составили 26,5 месяцев (медиана 15,7 месяцев). В нашем исследовании вероятность первого реэндопротезирования составила 10,4 %, второго 23 %, третьего 38,5 %, четвёртого 40 %. Частота реэндопротезирований после ревизионных операций в 2,4 раза выше, чем после первичного эндопротезирования.

**Заключение.** Правильный выбор дизайна ножки эндопротеза и способа фиксации при первичном и ревизионном эндопротезировании позволяет продлить срок службы эндопротеза, сократить количество повторных операций.

*В.А. Соколовский, А.В. Соколовский*

**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДИАФИЗАРНЫХ ЭНДОПРОТЕЗОВ ПРИ ПОРАЖЕНИИ КОСТИ ПЕРВИЧНЫМИ И МЕТАСТАТИЧЕСКИМИ ОПУХОЛЯМИ***ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Актуальность.** Индивидуализация реконструктивного хирургического лечения опухолей опорно-двигательного аппарата является сложной задачей, требующей максимально возможного топографо-анатомического выполнения оперативного лечения. Проведение тщательного анализа наиболее часто встречающихся осложнений при реконструкции бедренной и плечевой кости диафизарным эндопротезом, при первичном и метастатическом опухолевом поражении.

**Материалы и методы.** В течение 16 лет, с 1998 по 2014 год, 12 пациентам выполнена резекция диафиза бедренной и плечевой кости с последующим эндопротезированием. Резекция бедренной кости выполнена 8 пациентам, резекция плечевой кости 4. Среди пролеченных пациентов 4 пациента были с первичными саркомами кости, 7 с метастатическим поражением кости, 1 с множественной миеломой. Средний период наблюдения после операции составил 66,8 мес. (от 1 до 202). Реконструкция диафизарного дефекта выполнялась двумя типами эндопротезов: I тип – металлический сплав ножки эндопротеза с цементной фиксацией; II тип – цементный эндопротез, изготовленный из материала изоэластик (isoelastic RM) с дополнительной блокировкой ножек эндопротеза винтами.

**Результаты.** Общая выживаемость составила 92 %. В течение срока наблюдения в 66,7 % выявлено отсутствие любых механических и немеханических осложнений. В 16,7 % (2 пациента) выявлена асептическая нестабильность ножек эндопротеза: у 1 одного пациента с эндопротезом выполненным из сплава металла и у 1 пациента с эндопротезом изготовленным из материала изоэластик. У одного пациента с металлическим эндопротезом выявлена асептическая нестабильность и перелом ножки эндопротеза. Рецидив заболевания выявлен у 1 пациента (8,3 %). Все осложнения выявлены в группе пациентов после эндопротезирования бедренной кости. В течение всего периода наблюдений ни у одного пациента не выявлена перипротезная инфекция.

**Заключение.** Асептическая нестабильность и поломка ножки эндопротеза наиболее частые осложнения эндопротезирования диафиза бедренной и плечевой кости. Использование диафизарных эндопротезов не снижает онкологических результатов лечения при сохранении удовлетворительной функции конечности при условии четкого соблюдения показаний к эндопротезированию в онкоортопедии. Использование блокировочного винта ножки эндопротеза позволяет избежать развития асептической нестабильности эндопротеза.

*С.О. Соломевич, П.М. Бычковский, Т.Л. Юркитович, Н.В. Голуб, В.А. Алиновская, Р.И. Костерова***ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЦИСПЛАТИНА И ОКСАЛИПЛАТИНА НА ГИДРОГЕЛЯХ МОДИФИЦИРОВАННОГО ДЕКСТРАНА***НИИ ФХП БГУ, Минск, Республика Беларусь*

**Цель работы.** Создание пролонгированных биodeградируемых полимер-лекарственных форм цисплатина и оксалиплатина путем их иммобилизации на гелеобразующем декстрани с фосфорнокислыми и карбаматными группами (ФКД).

**Материалы и методы.** В качестве полимеров-носителей противоопухолевых веществ получены образцы ФКД с содержанием фосфорнокислых групп 1,7 – 3,7 ммоль /г, степенью набухания 10 – 222 г/г.

**Результаты и выводы.** Исследована сорбция цисплатина и оксалиплатина на микрочастицах ФКД. Иммобилизация цитостатиков на гидрогелях ФКД в основном протекает по механизму физической адсорбции, незначительная часть связывается по механизму ионного обмена. Установлено, что релиз цитостатиков протекает в две стадии, около 30 – 40 % цитостатиков высвобождается из фазы носителя в течение 1 часа, 50 – 60 % – в течение 6 часов, дальнейшее высвобождение протекает в ходе биodeградации полимера. В эксперименте *in vitro* показано, что полученные полимер-лекарственные формы цисплатина обладают сравнимой или превышающей цитостатической активностью по отношению к нативному цисплатину.

*Е.Ф. Странадо*



### КЛИНИЧЕСКАЯ И СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА России», Москва

**Актуальность.** Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это эффективный, безоперационный, органосохраняющий, щадящий и безопасный метод лечения рака различных наружных и висцеральных локализаций, а также целого ряда неопухолевых заболеваний. Метод ФДТ за счет однократности лечебной процедуры, проводимой при большинстве локализаций рака в амбулаторных условиях, позволяет значительно сократить сроки лечения по сравнению с наиболее распространенными хирургическим, лучевым и лекарственным методами терапии рака, уменьшить количество осложнений, восстановить трудоспособность в соответствующих возрастных группах или сократить сроки нетрудоспособности больных. В 2002 г. ФДТ впервые включена в «стандарты лечения» злокачественных опухолей, а с 2013 г. ФДТ официально признана в качестве одного из возможных альтернативных методов лечения большинства локализаций злокачественных новообразований.

**Цели исследования.** Оценить социально-экономическую эффективность ФДТ злокачественных опухолей по сравнению с традиционными методами лечения рака.

**Материалы и методы.** Оценка проведена на основании собственного опыта и данных отечественной и зарубежной литературы.

**Результаты и выводы.** ФДТ при раке головы и шеи в 3 раза дешевле хирургического лечения и почти в 2 раза дешевле паллиативной химиотерапии. ФДТ обеспечивает в среднем на 129 дней больше сохраненных жизней больных с распространенным опухолевым процессом по сравнению с интенсивным хирургическим лечением и на 48 дней больше сохраненных жизней по сравнению с химиотерапией. При сравнительной оценке эффективности паллиативной эндоскопической ФДТ и ИАГ-неодимовой лазерной реканализации при распространенном обтурирующем просвете раке пищевода отмечено, что оба метода обеспечивают улучшение состояния больных с регистрацией объективного эффекта воздействия на опухоль, но значительно более продолжительный эффект действия ФДТ и, соответственно, меньшие затраты при необходимости применения повторных паллиативных курсов лечения. При раке кожи средняя стоимость ФДТ (использована калькуляция стоимости медицинских услуг на 01.01.2013 г.) почти в 2 раза ниже средней стоимости лазерной фотодеструкции (31617 руб. против 62590 руб.) и в 3,2 раза ниже стоимости хирургического лечения с пребыванием в стационаре (102410 руб.). Эта разница в стоимости лечения обусловлена, прежде всего, характером однократной процедуры ФДТ, выполняемой у большинства больных в амбулаторных условиях, с одной стороны, и необходимостью пребывания в стационаре при хирургическом лечении, а также стоимостью самой хирургической операции, с другой. ФДТ с каждым днем все шире внедряется в повседневную клиническую практику. Этому способствуют ее преимущества перед традиционными методами лечения рака. Окончательным доводом в пользу ФДТ является экономическая эффективность ее применения.

*Н.М. Сураева, О.О. Рябая, Ю.А. Хоченкова, Л.Ф. Морозова, А.Ю. Барышников*

### ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМНОЙ ЛИНИИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ЭКСТРАКТА

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) представляет собой многостадийный процесс, связанный с изменениями в морфологии клеток и регуляции их генов. ЭМП встречается в злокачественных опухолях различной локализации, играя центральную роль в метастазировании и повышении их инвазивности. Наиболее характерным признаком ЭМП является потеря опухолевыми клетками маркеров экспрессии гена Е-кадгерина и увеличение экспрессии гена виментина.

**Задача исследования.** Оценить клетки ранее полученного нами субклона из меланомной линии человека Mel 1br, который обладал признаками стволовых клеток, на наличие характеристик ЭМП.

**Материалы и методы.** Клетки субклона культивировали в среде RPMI-1640 с добавками и 5% эмбриональной телячьей сывороткой в течение 2 – 3 пассажей до исследования на экспрессию маркеров ЭМП. Е-кадгерин и виментин определяли по уровню мРНК с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Наличие белков Е-кадгерина и виментина анализировали с помощью иммуноцитохимического окрашивания.

**Результаты.** Величина базальной экспрессии мРНК белков виментина и Е-кадгерина клеток родительской линии составила 1,77 о.е. и 2,02 о.е. соответственно. Клетки субклона имели практически идентичный уровень мРНК виментина (1,61 о.е.), при значительно меньшей экспрессии Е-кадгерина (0,56 о.е.). Иммуноцитохимические исследования показали наличие белка Е-кадгерина только в клетках родительской линии (около 30%), тогда как белок виментин присутствовал в обоих типах клеток, но в клетках субклона его было на 30% больше, и они имели более интенсивное окрашивание.

**Выводы.** Анализ уровней экспрессии генов Е-кадгерина и виментина выявил активацию процессов ЭМП в субклоне из меланомной линии человека Mel 1br по сравнению с родительской линией.

*А.В. Таллерова, О.С. Кузнецова, Д.А. Шацкий, С.В. Никитин, Л.П. Коваленко*

**ЭФФЕКТЫ СНК-411 НА ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ У МЫШЕЙ С LLC**

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

**Цель исследования.** Оценка влияния нового противоопухолевого соединения СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин), ранее показавшего в экспериментах ингибирование роста опухоли и выраженное снижение продукции IL-2, IL-4 и IL-6 в модели LLC у мышей C57Bl/6.

**Материалы и методы.** Взвесь опухолевых клеток LLC имплантировали мышам согласно общепринятой методике. СНК-411 в дозах 25 и 50 мг/кг вводили через 48 часов после инокуляции опухоли в течение 7 дней. Оценку спонтанной двигательной активности животных проводили на 9 сутки развития LLC на инфракрасном актиметре. Статистическую обработку данных проводили по непарному t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** На 9 сутки развития опухоли у животных с LLC выявлено снижение стереотипических движений в 2,8 раза, максимальной скорости движения в 2,7 раза и пройденного расстояния в 3,1 раза по сравнению с интактными мышами. У мышей-опухоленосителей, получавших СНК-411 в дозах 25 и 50 мг/кг, регистрировали стимулирование локомоторной активности в 1,3 и 1,2 раза по сравнению с интактными животными, восстановление максимальной скорости движения на 49 % (25 мг/кг), пройденного расстояния в 2,3 и 1,8 раза по сравнению с контрольными LLC-мышами и стереотипических параметров до значений интактных животных.

**Выводы.** Полученные результаты подтверждают развитие депрессивно-подобного поведения при онкогенезе и возможность коррекции психоэмоционального состояния новым противоопухолевым соединением СНК-411.

*П.А. Тараканов<sup>1</sup>, М.Е. Неганова<sup>1</sup>, Е.Н. Тараканова<sup>1</sup>, Д.В. Мищенко<sup>2</sup>*

**СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ПОРФИРАЗИНОВ  
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНО АКТИВНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ  
ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

<sup>1</sup>ИФВ РАН, Черногловка

<sup>2</sup>ИПХФ РАН, Черногловка

**Актуальность.** Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам тетрапиррольные макроциклы активно используются для создания на их основе фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ) рака. Синтез тетрапиррольных макроциклов, содержащих в своем составе 1,4-дiazепиновые гетероциклы, является одним из перспективных направлений создания фотосенсибилизаторов третьего поколения.

**Цель работы.** Разработка методов синтеза и экспериментально-теоретическое изучение связи структура – свойство полученных фотосенсибилизаторов на основе новых порфиразинов, обладающих светопоглощением в ближней ИК области.

**Материалы и методы.** Полученные соединения охарактеризованы ЭСП, ИК, ЯМР и флуоресцентной спектроскопией, а также MALDI-TOF масс-спектрометрией.

**Результаты и выводы.** Введение различных заместителей в 1,4-diazепиновый гетероцикл приводит к значительному изменению физико-химических свойств этих соединений. Последнее является фундаментальной проблемой для данного класса макрогетероциклов, изучение которой открывает возможность понимания механизмов, лежащих в основе управления их фотоактивностью для решения как терапевтических, так и диагностических задач.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (14-03-32031).*

*Л.Р. Тилова<sup>1</sup>, О.И. Задорожная<sup>1</sup>, А.В. Савинкова<sup>1</sup>, К.И. Курсанов<sup>1</sup>, А.М. Оглоблина<sup>1</sup>, М.Г. Якубовская<sup>1</sup>, И.В. Будинова<sup>2</sup>, Г.А. Белицкий<sup>1</sup>, Е.А. Лесовая<sup>1</sup>*

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИГАНДОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА**

<sup>1</sup>ФГБНУ "РОИЦ им. Н.Н. Блохина", Москва

<sup>2</sup>Northwestern University, Chicago, USA

**Актуальность.** Использование селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) в химиотерапии гемобластозов является перспективным направлением исследований. SEGRA активируют рецептор только по механизму транс-репрессии, что обуславливает сниженные побочные эффекты. Ранее нами был продемонстрирован синергический противоопухолевый эффект ингибитора протеасом бортезомиба и соединения класса SEGRA, CpдA.

**Цель работы.** Изучение комбинированного действия лигандов GR и ингибиторов белка REDD1, убиквитин-протеасомной системы, и узкобороздочных лигандов на клетки лейкозов и лимфом.

**Материалы и методы.** Цитотоксический эффект определяли путем подсчета клеток; транс-репрессию и транс-активацию оценивали путем люциферазного анализа и ПЦР; уровень экспрессии GR, p-GR, REDD1, p-S6 и S6 определяли Вестерн-блоттингом

**Результаты и выводы.** Показан синергизм цитотоксического действия CpдA и рапамицина. Продемонстрировано, что дексаметазон в комбинации с рапамицином проявляет свойства SEGRA, селективно запуская транс-репрессию. Данная комбинация крайне перспективна для применения в терапии гемобластозов, так как рапамицин и дексаметазон являются хорошо изученными препаратами.

*С.Е. Титов<sup>1,2</sup>, М.К. Иванов<sup>2</sup>, О.А.Климова<sup>1,2</sup>, Е.В. Карпинская<sup>2</sup>, Е.В. Цивликова<sup>2</sup>, С.П. Шевченко<sup>3</sup>, Т.Л. Полоз<sup>4</sup>,*

П.С. Деменков<sup>5</sup>, И.Ф. Жимулев<sup>1</sup>, Н.Н. Колесников<sup>1</sup>  
**МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
 В ОПЕРАЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ ОТ ПАЦИЕНТОВ ИЗ НОВОСИБИРСКА:  
 АНАЛИЗ НАЛИЧИЯ МУТАЦИИ BRAF V600E,  
 ТРАНСЛОКАЦИИ RET-PTC1 И МИКРОРНК-ПРОФИЛИРОВАНИЕ**

<sup>1</sup>ИМКБ СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>ЗАО "Вектор-Бест", Кольцово

<sup>3</sup>МБУЗ г. Новосибирска ГКБ №1, Новосибирск

<sup>4</sup>НУЗ «ДКБ на ст. Новосибирск-Главный ОАО «РЖД», Новосибирск

<sup>5</sup>ИЦИГ СО РАН, Новосибирск

**Задача работы.** Разработка алгоритма молекулярно-генетического постоперационного типирования опухолей ЩЖ, дополняющего и уточняющего гистологический анализ.

**Материалы и методы.** В работе использовали выборку образцов опухолевой ткани ЩЖ, хирургически удаленных у 208 пациентов (контроль – прилегающая условно нормальная ткань). Согласно первичному гистологическому заключению, выборка включала 128 злокачественных и 80 доброкачественных новообразований разных типов. В каждой пробе определяли содержание 13 микроРНК, а также наличие транслокации RET-PTC1 и мутации BRAF V600E.

**Результаты и выводы.** На основании анализа результатов был разработан алгоритм типирования, позволяющий уточнить спорные результаты гистологического заключения, служившего референсным методом. Для 21 пациента результаты молекулярного типирования противоречили первичному гистологическому заключению. В 19 из них последнее указывало на доброкачественное новообразование, несмотря на наличие молекулярных маркеров, соответствующих раку. Повторное заключение, выполненное более опытным патологом, в 11 из этих случаев совпало с молекулярным типированием и выявило рак. В двух образцах из оставшихся, дважды гистологически классифицированных как «доброкачественные», была выявлена мутация BRAF V600E, характерная для рака. Полученные результаты показывают практическую возможность использования микроРНК и соматических онкогенных мутаций в качестве вспомогательных молекулярных маркеров, позволяющих повысить точность постоперационного типирования опухолей ЩЖ.

*Ю.А. Титова, О.В. Федорова, А.Ю. Вигоров, Д.А. Груздев, В.П. Краснов, Г.Л. Русинов, В.Н. Чарушин*

**НОВЫЙ ПОДХОД К АСИММЕТРИЧЕСКОМУ СИНТЕЗУ МОНАСТРОЛА**

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

**Актуальность.** Монастрол является представителем семейства дигидропиримидиновых гетероциклов. В настоящее время монастрол активно изучается в качестве противоракового агента благодаря его специфическому влиянию на деление клеток. Известно, что фармакологические свойства 4-арилзамещенных дигидропиримидинов зависят от абсолютной конфигурации стереоцентра С(4). Согласно литературным данным, энантиомеры монастрола являются мощными ингибиторами Eg5 белка KSP. Причем активность S-энантиомера монастрола в 15 раз превышает активность R-энантиомера.

**Цель исследования.** Нахождение условий и катализаторов для асимметрического синтеза монастрола в результате многокомпонентной реакции (реакции Биджинелли).

**Материалы и методы.** В качестве хиральных индукторов реакции Биджинелли в настоящее время успешно используются производные пролина и 4-гидроксипролина. Нами синтезирован ряд новых хиральных индукторов – амиды (S)-пролина и амиды 4-гидроксипролина (2S,4R)- и (2S,4S)-рядов, включающие остатки алифатических и ароматических аминов, а также фрагменты хиральных гетероциклических аминов. В качестве гетерогенных катализаторов использовались наноразмерные оксиды металлов с размером частиц 20-80 нм, синтезированные золь-гель методом.

Классически продукты реакции Биджинелли получают в условиях кипячения в присутствии кислоты. Однако проведение реакций при температуре окружающей среды более благоприятно для повышения их стереоселективности. В результате исследования нами были найдены оптимальные условия асимметрического синтеза монастрола: температура 23 °С, тетрагидрофуран, соотношение исходных реагентов альдегид : кетозфир : тиомочевина = 1 : 3 : 2, загрузка хирального индуктора 10 мол%.

**Результаты.** Показано, что в случае монастрола известный хиральный индуктор реакции Биджинелли трифторацетат (2S,4R)-4-гидроксипролил-(S)-1-фенилэтиламина не влияет на энантиомерный избыток (*ee*) продукта, однако в присутствии амидов (2S,4R)-4-гидроксипролина с бензоксазиновым или диоктильным остатками значения *ee* составили 22 и 30 %, соответственно. Впервые показано, что добавление в реакционную смесь наноразмерного оксида SiO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub> позволяет увеличить *ee* до 40 – 45 %, в то время как наноксид SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> не влияет на активность хирального индуктора.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-03-12188 офу\_м) и УрО РАН (Проект 15-21-2-5).*

*И.Д. Трещалин<sup>1</sup>, М.И. Трещалин<sup>1</sup>, К.К. Николаева<sup>1</sup>, Н.В. Ерёмкин<sup>1</sup>, Д.Г. Козлов<sup>2</sup>, С.В. Яроцкий<sup>2</sup>, Э.Р. Переверзева<sup>1</sup>*  
**СУБХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ**

**РЕКОМБИНАНТНОЙ БИОМОДИФИЦИРОВАННОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ Was79**<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИНА», Москва<sup>2</sup>ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва

**Цель исследования.** Изучение на крысах субхронической токсичности L-аспарагиназы Was79, производной природного фермента *Wolinella succinogenes*, полученного в ФГУП «ГосНИИгенетика».

**Материал и методы.** Исследования проведены на беспородных крысах самцах и самках. Препарат вводили внутривентриально в разовых дозах 1200 и 12000 МЕ/кг (1 и 10 терапевтических доз (ТД) для крыс в пересчете с ТД для человека) ежедневно 15 дней. Параметры исследования: масса тела, ЭКГ, клинический и биохимический анализ крови, и клинический анализ мочи.

**Результаты.** Состояние и поведение животных было без особенностей. Прирост массы тела не отличался от контроля. Гематологические показатели и ЭКГ не изменялись. На 1 сутки после курса повышалась активность АЛТ у самцов, получавших 10 ТД препарата. Активность щелочной фосфатазы повышалась как у самцов, так и у самок. Препарат в дозе 10 ТД, на 1 сутки вызывал появление в моче эритроцитов и белка. К концу наблюдения все показатели возвращались к норме.

**Выводы.** L-аспарагиназа Was79 аналогична известной L-аспарагиназе *E. coli* и проявляет гепато- и нефротоксические свойства при 10-кратном превышении разовой ТД.

И.Д. Трещалин, Т.Б. Переверзева, Е.В. Возняковская, А.Е. Щекотихин, Э.Р. Переверзева

**СУБХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ЛХТА-2034LB5**

ФГБНУ «НИИНА», Москва

**Цель исследования.** Оценка токсических свойств оригинального мультитаргетного противоопухолевого препарата ЛХТА-2034 LB5.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на беспородных крысах самцах. Препарат вводили внутривентриально ежедневно 15 дней в разовых дозах 3 и 4,5 мг/кг, суммарно составляющих МПД и ЛД<sub>50</sub> соответственно. Ежедневно на протяжении всего эксперимента оценивали состояние и поведение животных. На протяжении курса и по его окончании контролировали состав периферической крови. На 1 и 30 сутки после курса производили биохимический анализ крови, анализ мочи, ЭКГ, проводили патоморфологическое исследование органов и тканей.

**Результаты.** В функциональных, гематологических, биохимических и других клинических тестах никаких токсических свойств соединения ЛХТА-2034LB5 не выявлено. Изучение патологических изменений внутренних органов крыс показало, что курсовое применение препарата в дозе, суммарно составляющей МПД, не оказывает повреждающего действия на структуру органов и тканей животных. Введение препарата в дозе, суммарно составляющей ЛД<sub>50</sub>, приводит к повреждению структуры печени, почки, сердца, двенадцатиперстной и тощей кишки.

**Выводы.** Зависимость изменений структуры внутренних органов крыс, возникающих под действием ЛХТА-2034LB5, от величины примененной дозы позволяет рекомендовать препарат для дальнейшего изучения.

А.А. Тумашов, В.В. Мусияк, Т.В. Матвеева, Г.Л. Левит, В.П. Краснов

**ВАЛИДАЦИЯ ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА****ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ОРМУСТИН**

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

**Актуальность.** В настоящее время ИОС УрО РАН совместно с РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН проводят доклинические исследования нового противоопухолевого препарата Ормустин, относящегося к классу алкилнитрозомочевин (АНМ). Субстанция Ормустина представляет собой смесь изомеров положения нитрозогруппы в АНМ на основе аминокислоты орнитина. Для контроля качества субстанции препарата Ормустин были разработаны методики количественного определения содержания основного вещества (СОВ) и изомерного состава.

**Задачи исследования.** Показать путем лабораторных исследований, что методики количественного определения СОВ и изомерного состава позволяют корректно контролировать основные показатели качества субстанции Ормустина.

**Материалы и методы.** Количественное определение СОВ в субстанции Ормустина проведено спектрофотометрическим методом; валидация методики проведена по следующим характеристикам: специфичность, линейность и прецизионность. Определение изомерного состава в субстанции Ормустина проведено методом ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте; валидацию проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел количественного определения (ПКО) и робастность. Оценка прецизионности и правильности проведена на пяти модельных смесях, полученных смешением индивидуальных изомеров Ормустина.

**Результаты и выводы.** Установлено, что методика количественного определения СОВ обладает высокой специфичностью при выполнении анализа при длине волны 396 нм; показана линейность метода в интервале концентраций от  $3 \times 10^{-3}$  до  $11 \times 10^{-3}$  моль/л. Соответствие методики критерию прецизионности подтверждено расчетами показателей относительного стандартного отклонения, суммарной неопределенности анализа, критериев Фишера и Стьюдента. Показано, что методика ВЭЖХ определения изомерного состава обладает высокой специфичностью и надежностью, линейностью в диапазоне концентраций от 0,2 до 200 мкг/мл, ПКО составил 0,2 мкг/мл. Для всех модельных систем вычисленное значение критерия Стьюдента не превышало табличного. Разработанные методы контроля качества фармацевтической субстанции в результате лабораторных испытаний подтвердили возможность их применения для анализа образцов субстанции, предназначенных для приготовления лекарственной формы препарата Ормустин.

Работа выполнена в рамках Госконтракта № 13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

Е.Г. Тырсина

**СПОСОБНО ЛИ ОБЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАТЬ**

**В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАЗВИТИЕ ПЕРЕКРЁСТНОЙ РАДИО-ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ?***ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

**Актуальность.** Появление рецидивов и повышение их радиорезистентности после курса ЛТ – одна из нерешенных проблем радиационной онкологии. Более того, по ряду сообщений, клетки рецидивов наряду с радиорезистентностью могут приобретать и устойчивость к химиопрепаратам. Ранее *in vitro* нами была выделена радиорезистентная линия потомков злокачественных фибробластов хомячка ПОК-20, выживших после  $\square$ -облучения родительских клеток ДХ-ТК в дозе 20 Гр.

**Цель исследования.** Выяснение вопроса, не индуцировало ли облучение в клетках ПОК-20 кроме втрое возросшей радиорезистентности, возникновения устойчивости к химиопрепаратам?

**Материалы и методы.** Для этого сравнили чувствительность исходных клеток и её радиорезистентного варианта к противоопухолевым агентам различного механизма действия (цисплатине, адриамицину, колхицину, пурамицину, винбластину, Ага-С, мелфолану, циклогексимиду, актиномицину Д), которые инкубировали с клетками в концентрациях от  $10^{-4}$  до  $10^{-10}$  М. Исследования проводили двумя методами: по колониеобразующей способности и МТТ-тестом. Критерием цитотоксичности служила величина  $ID_{50}$  – концентрация препарата, инактивирующая 50 % клеток.

**Результаты и выводы.** Из 9 веществ возникновение устойчивости в ПОК-20 обнаружено только по отношению к цисплатине; радиорезистентные клетки оказались в 10 раз более устойчивы к этому препарату, чем родительские. Уровень цитотоксичности остальных 8 препаратов для клеток обеих линий достоверно не различался. Данный факт можно объяснить сходством механизмов повреждающего действия ионизирующей радиации и цисплатины, а именно, индукцией свободно-радикальных процессов, основной мишенью которых является клеточное ядро. В отличие от цисплатины, реакция клеток на другие химиопрепараты в основном обусловлена изменениями транспорта этих веществ через клеточную мембрану. По литературным данным, именно устойчивость к препаратам платины сопутствует приобретённой радиорезистентности злокачественных клеток; однако нигде не отмечалась обратная картина, когда в результате развития лекарственной устойчивости клетки стали бы радиорезистентны.

Мы полагаем, что вероятность возникновения химиорезистентности после облучения злокачественных клеток следует учитывать при проведении комбинированной лучевой-химиотерапии опухолей, а также при выборе тактики лечения радиорезистентных рецидивов.

*Е.Г. Тырсина***ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА АВЗВ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПРОГНОЗА И МОНИТОРИНГА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ.***ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва*

**Актуальность.** Разработка новых подходов для прогноза индивидуальной чувствительности пациентов к лучевой и химиотерапии остается актуальной задачей. В последнее время предлагают в качестве детерминанты в реакции клетки на внешнее воздействие рассматривать конформацию интерфазного хроматина. К чувствительным методам, позволяющим регистрировать структурные перестройки хроматина, относится метод аномальных временных зависимостей вязкости (АВЗВ). Ранее *in vitro* с применением этого метода нами было показано, что устойчивость опухолевых клеток к радиации и цисплатине прямо коррелирует с компактизацией их хроматина. Предполагая, что метод АВЗВ может оказаться чувствительным не только на клеточном, но и на организменном уровне, целью исследования являлась оценка возможности использования метода АВЗВ в качестве средства индивидуального прогноза и мониторинга проводимого лечения.

**Материалы и методы.** Для исследований использовали ядродержащие клетки крови 48 больных раком молочной железы и 10 здоровых доноров в качестве контроля. Клетки в заданной концентрации лизировали по стандартной методике, после чего проводили измерения вязкости нуклеоидов на ротационном вискозиметре. В качестве оценочного критерия компактизации хроматина использовали среднюю величину максимальной приведённой (на клетку) вязкости  $\eta$ . У всех больных параметр  $\eta$  измеряли до лечения, а у 20 пациентов ещё в течение 1 недели после терапии.

**Результаты и выводы.** В группе здоровых доноров отмечена тенденция снижения степени компактизации хроматина с возрастом. Показатели вязкости хроматина лимфоцитов здоровых людей находились в диапазоне  $(20 - 40) \times 10^{-6}$  на клетку, в то время как вариативность этого параметра у больных была существенно шире, составляя  $(4 - 80) \times 10^{-6}$  на кл. Показано, что плотность хроматина в клетках онкобольных ниже, чем у здоровых до 40 лет и практически не отличается от степени компактизации у пожилых людей старше 60 лет. В ходе ЛТ обнаружено, что больные с исходно релаксированным хроматином ( $\eta > 50 \times 10^{-6}$ ) крайне тяжело переносят назначенный курс радиотерапии. При химиотерапии, через сутки после введения препаратов (адреабластин, циклофосфан, 5-фторурацил) в клетках крови пациентов была зарегистрирована резкая относительная релаксация хроматина в 3 – 12 раз, которая на 3 – 4 день сменялась компактизацией, уровень которой все же был значимо ниже исходной. Однако при повторном курсе химиотерапии вязкость хроматина в течение 1 недели оставалась на аномально высоком уровне ( $\eta > 50 \times 10^{-6}$ ). Выявленные закономерности между плотностью упаковки хроматина и реакцией пациента на противоопухолевую терапию показывают сниженную адаптационную возможность конформационных переходов хроматина в ответ на внешнее воздействие у онкобольных. При этом степень компактизации интерфазного хроматина и её изменения в ходе проводимой терапии, по-видимому, является специфической реакцией, отражающей текущее физиологическое состояние организма.

*А.А. Фильченков<sup>1</sup>, М.П. Завелевич<sup>1</sup>, Л.М. Куява<sup>1</sup>, В.В. Семенов<sup>2</sup>, М.Н. Семенова<sup>3</sup>***СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ И АНТИМИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

**НОВЫХ ИЗОКСАЗОЛЬНЫХ И ПИРАЗОЛЬНЫХ АНАЛОГОВ КОМБРЕТАСТАТИНА А4 (КА4)**<sup>1</sup>ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев<sup>2</sup>ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва<sup>3</sup>ИБР им. Н.К.Кольцова РАН, Москва

**Задачи исследования.** Большое количество современных исследований в области медицинской химии посвящено разработке новых синтетических аналогов комбретастатинов, обладающих конфигурационной стабильностью, сильным антипролиферативным действием наряду с минимальными побочными эффектами и способностью преодолевать множественную лекарственную устойчивость. Пятичленные гетероциклы, в том числе изоксазолы и пиразолы, рассматриваются как биоизостерная, неизомеризуемая и метаболически устойчивая замена двойной связи в *цис*-стильбенах, закрепляющая кольца А и В в *цис*-положении, что необходимо для оптимального связывания с тубулином – клеточной мишенью комбретастатинов.

**Материалы и методы.** Комбретаизоксазолы (NMR/57797, NMR/57574) и комбретапиразолы (NMR/57525, NMR/97854, NMR/97897, NMR/57607) были синтезированы в ИОХ. Для сравнения использовали КА4 (OXiGENE Inc., США). Цитотоксическую активность соединений исследовали *in vitro* на клетках линии Jurkat T-клеточного лимфолейкоза человека. Определяли эффективную концентрацию препаратов, вызывающую гибель 50 % клеток в культуре за 72 ч инкубации (ЭК<sub>50</sub>). Антимитотическое действие соединений исследовали *in vivo* на зародышах морского ежа *Paracentrotus lividus* L. Определяли эффективную пороговую концентрацию препаратов, вызывающую нарушение или остановку деления яйцеклеток после оплодотворения (дробление) и изменение подвижности зародышей. Оседание зародышей на дно сосуда с последующим спиннингом является свидетельством того, что антимитотическое действие испытуемого соединения обусловлено дестабилизацией микротрубочек.

**Результаты и выводы.** Результаты исследований на зародышах морского ежа показали, что все испытанные аналоги КА4 вызывают спиннинг зародышей в субмикромольных концентрациях. Комбретаизоксазолы NMR/57797 и NMR/57574 оказались более токсичными для клеток Jurkat в сравнении с комбретапиразолами, причем ЭК<sub>50</sub> соединения NMR/57797 была на порядок ниже, чем у КА4, и составила 0,5 нмоль/л. Среди комбретапиразолов наиболее активные соединения NMR/97854 и NMR/57607 имели ЭК<sub>50</sub> 15 нмоль/л и 25 нмоль/л, соответственно, тогда как NMR/57525 и NMR/97897 были на порядок менее токсичными. В случае комбретаизоксазолов результаты, полученные на зародышах морского ежа, а именно способность этих соединений нарушать дробление и плавательное поведение зародышей, хорошо совпадают с данными по цитотоксичности на клетках Jurkat. Результаты исследования свидетельствуют о высокой цитотоксической и антимитотической активности новых синтетических производных КА4.

Н.А. Харьковца**ПЕРЕВЯЗОЧНЫЕ СРЕДСТВА «КОЛЕГЕЛЬ» В ЛОР-ПРАКТИКЕ**

ВУЗ ВО ВГКБ № 17, Воронеж

**Цель исследования.** Определить эффективность полифункциональной депо-системы на гелевой основе «Колегель-АДЛ» пролонгированного действия с использованием фактора «покоя» для раневой поверхности послеоперационных больных по поводу онкологических пролиферативных процессов синоназальной зоны, с направленным подведением к этой локализации введенных в данное перевязочное средство (ПС) фармакологических препаратов.

**Материалы и методы.** Высокоструктурированный перевязочный материал «Колегель-АДЛ», содержащий диоксидин (0,5 +1 мг/см), лидокаин (1,5 + 1 мг/см) и полимерную основу – альгинат натрия, обладающую гемостатическим, противовоспалительным, регенерирующим действием.

**Результаты.** На фоне использования перевязочных средств на гелевой основе с диоксидином, лидокаином и альгинатом натрия в первой фазе раневого процесса, по данным клинико-лабораторных исследований, раневая поверхность санировалась к 2 – 3 суткам, что на 2 – 5 дней раньше, чем в контрольной группе. Антисептик диоксидин, уменьшает риск инфицирования раневых поверхностей, что к 5 – 7 суткам позволяет уменьшить воспалительные реакции со стороны общих анализов крови и мягких тканей, это на 2 – 3 дня раньше чем в контрольной группе. Использование «Колегель-АДЛ» высокой степени структурируемости и упругости в качестве длительно стоящего тампона, с импрегнированным в ПС анестетиком лидокаином, уменьшало болевую импульсацию локально, позволяя уменьшить парентеральное применение обезболивающих средств. Уменьшалось количество перевязок, способствуя «тканевому покою» раны, и обеспечивая пролонгированную дозированную доставку лекарственных препаратов к раневой площади, сам перевязочный материал впоследствии подвергается биодеструкции. При паллиативных операциях на синоназальном комплексе данное перевязочное средство не на тканевой основе предотвращает такие осложнения как ликворея, восходящий менингит, кровотечение.

**Вывод.** Таким образом, данная полифункциональная депо-система на гелевой основе может быть рекомендована для местного лечения раневого процесса в оториноларингологии в плане терапии и профилактики гнойных осложнений раневых поверхностей больных с онкопатологией синоназальных синусов, как местное противовоспалительное, гемостатическое, антисептическое и обезболивающее средство. Данное ПС высокой степени структурируемости и упругости может быть применено в качестве длительно стоящего тампона, не требующего смены, и впоследствии биодеструктурируемого.

Д.С. Хачатрян<sup>1</sup>, А.В. Колотаев<sup>1</sup>, А.Н. Балаев<sup>2</sup>, В.Н. Осипов<sup>2</sup>, К.А. Охманович<sup>2</sup>**ДИЗАЙН И СИНТЕЗ НОВЫХ ЛИНЕЙНЫХ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ СОМАТОСТАТИНА**<sup>1</sup>ФГУП «ИРЕА», Москва

<sup>2</sup>ЗАО «Фарм-Синтез», Москва

**Задачи исследования.** Выбор вариантов и разработка оптимальных методов синтеза пептидных аналогов гипоталамического гормона соматостатина.

**Материалы и методы.** Аналоги соматостатина в настоящее время широко применяются в диагностике и лечении различных заболеваний, особенно эндокринных расстройств и рака, в том числе препараты Октреотид и Ланреотид, широко используемые в медицинской практике. Исследования в области синтеза новых пептидных аналогов соматостатина постоянно расширяются. Одним из перспективных направлений является поиск активных соединений в области коротких линейных пептидов с различными функциональными заместителями. Наша работа направлена на синтез модифицированных линейных пентапептидов, являющихся фрагментами природного соматостатина.

**Результаты.** На основании анализа литературных данных проведён выбор вариантов модифицированных пентапептидов и стратегий их синтеза. Разработаны новые оптимизированные методы получения защищённых аминокислот, используемых для синтеза целевых пентапептидов. Разработанные методы позволяют получать защищённые аминокислоты с хорошими выходами и высокими показателями качества, при наименьшей затрате средств, с низкой себестоимостью производства. Исследованы возможности получения защищённых аминокислот одnoreакторным методом, включающим в себя две стадии синтеза. Исследовано влияние на выход и чистоту конечных соединений таких условий как использование различных реагентов, их соотношения и параметров проведения процесса.

**Выводы.** В результате проведённых исследований разработаны новые одnoreакторные методы синтеза двух защищённых аминокислот:  $\epsilon$ -N-трет-бутилоксикарбонил-L-лизина и N-трет-бутилоксикарбонил-1.3-L-тиазолидин-4-карбоновой кислоты и оптимизированы условия синтеза пяти защищённых аминокислот, используемых для синтеза пептидных аналогов соматостатина.

А. Хашем<sup>1</sup>, Е.В. Игнатьева<sup>2</sup>, М.Т. Зангиева<sup>2</sup>, В.П. Краснов<sup>3</sup>, Л.А. Король<sup>1</sup>, А.Ю. Барышников<sup>2</sup>

#### РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ЛИПОСОМАЛЬНОГО ЛИЗОМУСТИНА

<sup>1</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

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

<sup>3</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

**Актуальность.** На сегодняшний день включение противоопухолевых агентов в состав наночастиц дает возможность значительно снизить токсичность и повысить эффективность лекарственной терапии за счет уменьшения концентрации свободного препарата в кровеносном русле. В частности, липосомы пролонгируют действие препарата, предотвращают развитие побочных реакций и обладают высокой биодоступностью. Лизомустин – оригинальный отечественный препарат, созданный совместно Институтом органического синтеза Уральского отделения АН СССР и ВОИЦ АМН СССР. Он обладает высокой противоопухолевой активностью в отношении широкого спектра опухолей экспериментальных животных как солидных (рак легкого LLC, рак шейки матки РШМ-5, карциномы Са-775, меланомы В-16 и др.), так и лейкозов (L-1210, P-388, МОРС, лейкоз Мазуренко и др.), превосходя по эффективности известные противоопухолевые соединения различных классов. Основным недостатком лизомустина является невысокая избирательность действия на опухолевые клетки, и отсюда – значительная общая токсичность. Это делает актуальной проблему создания лекарственных форм (ЛФ) нитрозопроизводных, увеличивающих избирательность их противоопухолевого действия.

**Цель исследования.** Разработать технологию получения липосомальной формы лизомустина.

**Результаты.** Точные навески фосфатидилхолина, холестерина и ПЭГ растворяли в хлороформе. Затем липидную пленку сушили на роторном испарителе. Включение препарата проводили по принципу пассивной загрузки. Липидную пленку гидратировали раствором субстанции лизомустина в 10 мл деионизированной воды путем интенсивного встряхивания колбы до полного смывания липидной пленки со стенок колбы и образования белой эмульсии. Полученную липидную пленку подвергали экструзии через поликарбонатные фильтры с размером пор 400, 200 и 100 нм с помощью мини-экструдера (Avanti Polar Lipids). Измерение среднего диаметра наночастиц проводили на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp-380 (США). Для разделения включившегося от не включившегося в частицы препарата использовали метод гель-фильтрации на колонке С10/20 (GE Healthcare, Великобритания), заполненную сефадексом G-50. Содержание препарата в везикулах определяли методом спектрофотометрии при  $\lambda$  230±2 нм.

**Выводы.** Получена липосомальная форма лизомустина. Степень загрузки препарата в липосомы составляет 50±2 %. Размер липосом составляет 130±5 нм.

Н.Р. Хилал<sup>1</sup>, А.В. Калугин<sup>1</sup>, Д.В. Новиков<sup>1</sup>, Р.Г. Пегов<sup>2</sup>, А. Кашанова<sup>2</sup>, А.В. Алясова<sup>2</sup>, В.В. Новиков<sup>1</sup>

#### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ RAGE И TRAG3 В КРОВИ БОЛЬНЫХ РТК

<sup>1</sup>ННГУ им Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО НижГМА, Нижний Новгород

**Актуальность.** Поиск новых молекулярных маркеров для мониторинга и ранней диагностики рака толстой кишки (РТК) является актуальной задачей. Известны раково-тестикулярные гены RAGE и TRAG3. Показана высокая экспрессия гена RAGE в крови больных раком почки, легкого и простаты. Ген TRAG3 был выявлен в образцах опухоли молочной железы и мочевого пузыря. Экспрессия генов RAGE и TRAG3 при РТК мало изучена. В данной работе проведен анализ частоты обнаружения мРНК генов RAGE и TRAG3 в образцах крови больных РТК для оценки их диагностической информативности.

**Материалы и методы.** Проанализировано 36 образцов периферической крови больных РТК. Матричную РНК генов RAGE и TRAG3 определяли с помощью двухраундовой ОТ-ПЦР. Визуализацию результатов проводили с использованием электрофореза нуклеиновых кислот.

**Результаты и выводы.** Проведенный анализ выявил мРНК TRAG3 гена в крови 4 из 36 образцов (11,1 %) и мРНК RAGE гена в крови 2 из 36 образцов (5,5 %). Все эти образцы имели схожую стадию развития опухоли (третью и четвертую). У всех больных, положительных к генам TRAG3 и RAGE, наблюдались метастазы в печени или легких. Таким образом, частота встречаемости мРНК генов TRAG3 и RAGE в крови больных РТК не является высокой, а наличие мРНК этих генов свидетельствует о тяжелом течении заболевания.

Т.С. Хлыстова<sup>1</sup>, М.А. Коровина<sup>1</sup>, Н.Д. Олтаржевская<sup>1</sup>, Я.Б. Миркин<sup>2</sup>

### ЛЕЧЕБНЫЕ ГИДРОГЕЛЕВЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В УРОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

<sup>1</sup>ООО «КОЛЕТЕКС», Москва

<sup>2</sup>ООО «Международный медицинский центр «УРО-ПРО», Москва

**Актуальность.** В последние годы большое внимание уделяется не только вопросам повышения эффективности лечения онкологических больных, но и сохранению качества их жизни. Так, одним из самых распространенных осложнений у пациентов, получающих химиотерапию, особенно в сочетании с лучевой терапией по поводу рака мочевого пузыря, является цистит различной этиологии и явление гематурии. Учитывая агрессивное воздействие, оказываемое проводимым лечением на организм пациента и непосредственно на органы малого таза (особенно на уретеллий), курс лечения для таких больных связан с болями, расстройствами мочеиспускания, симптомами общей интоксикации.

**Цель исследования.** Определить эффективность использования полимерных гидрогелевых биodeградируемых материалов «Колегель-Уролайн» на основе альгината натрия с лекарственными препаратами для профилактики и лечения реакций со стороны мочевого пузыря пациентов, страдающих лучевым циститом.

**Материалы и методы.** В исследовании участвовали 68 женщин: 30 здоровых добровольцев и 38 женщин, страдающих лучевым циститом. Материалы гидрогелевые на основе альгината натрия в шприцах по 20 мл: «Колегель-уро» с диоксидином и лидокаином, «Колегель-Уролайн» с деринатом. До начала исследования был определен уровень ИЛ-8 в моче у всех участниц. Затем пациенткам с лучевым циститом был проведен курс внутривезикулярной терапии гидрогелевыми композициями «Колегель-Уролайн»: 1 этап – 8 инстилляций композиции, содержащей альгинат натрия, диоксидин и лидокаин (2 раза в неделю); 2 этап – 8 инстилляций композиции, содержащей альгинат натрия, деринат и лидокаин (2 раза в неделю). Через 2 недели после окончания лечения была выполнена оценка концентрации ИЛ-8 в моче. Кроме того, оценивался болевой синдром по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) и поллакиурия.

**Результаты.** В исследуемой группе уровень ИЛ-8 до лечения составил  $59,5 \pm 20,5$ , после лечения –  $9,4 \pm 2,8$  (пг/мл). Болевой синдром по ВАШ: до лечения  $6,8 \pm 2,2$ , после –  $3,1 \pm 0,8$ . Поллакиурия снизилась с  $28,1 \pm 7,3$  до  $13,5 \pm 3,8$ .

**Выводы.** Внутривезикулярная терапия гидрогелевыми композициями на основе альгината натрия «Колегель-Уролайн» продемонстрировала свою эффективность при лучевом цистите и может быть рекомендована для широкого внедрения в клиническую практику.

Л.М. Хромых, Н.П. Маркова, И.С. Голубева, А.А. Калинина, И.А. Кудрявцев, Д.Б. Казанский

### ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИКЛОФИЛИНА А ЧЕЛОВЕКА

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

**Актуальность.** Циклофилин А (ЦфА, 18 кДа) белок, обладающий изомеразной активностью и участвующий в регуляции клеточной пролиферации, передаче сигнала от Т-клеточного рецептора, обладает антиоксидантными свойствами. ЦфА является провоспалительным фактором, индуцируя миграцию миелоидных клеток и активированных Т-лимфоцитов.

**Цель работы.** Изучение влияния рекомбинантного ЦфА человека (рЦфА) на рост *in vivo* опухолей различного гистогенеза.

**Материалы и методы.** Использованы штаммы перевиваемых опухолей мышей: рак шейки матки РШМ-5, аденокарцинома молочной железы Са 755, меланома В16, карцинома легкого Льюиса LLC. Белок вводили в дозе 100 мкг/мышь в течение 7 дней после перевивки опухоли. Оценка эффективности рЦфА осуществляли по показателям торможения роста опухолей (ТРО) и увеличению продолжительности жизни мышей (УПЖ).

**Результаты.** Наиболее значительный эффект рЦфА отмечался у мышей с РШМ-5. ТРО на 43 сутки роста этой опухоли составляло 59 %, УПЖ мышей достигало 46 %. Достоверный уровень ТРО наблюдался также при действии рЦфА у мышей меланомой В16 (25 день), карциномой Льюиса (18 день) и карциномой молочной железы Са755 (20 день).

**Вывод.** Полученные данные показывают, что рЦфА обладает выраженным противоопухолевым эффектом у мышей с новообразованиями разного гистогенеза.

В.А. Чалей, О.И. Коняев, Н.Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, А.А. Сергеев, К.А. Сережин, В.М. Бухман

### ИЗУЧЕНИЕ «ОСТРОЙ» ТОКСИЧНОСТИ ОРМУСТИНА НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ



*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Цель исследования.** Изучение «острой» токсичности лиофилизированной лекарственной формы ормустина (ЛЛФО) на мышах и крысах.

**Материалы и методы.** Работа проведена на 120 здоровых мышах самцах и самках линии BDF<sub>1</sub>, полученных из питомника «Столбовая», и 144 здоровых неинбредных беспородных крысах-самцах, полученных из разведения ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Изучена «острая» токсичность ЛЛФО на 3-х сериях: 031013, 060114, 080114. Препарат вводили однократно внутривенно в диапазоне доз 120 – 300 мг/кг в рекомендованной концентрации 15,7 мг/мл (растворитель – 5% раствор глюкозы). Срок наблюдения за животными составил 30 суток.

**Результаты.** При изучении «острой» токсичности ЛЛФО на мышах-самках наблюдалась гибель животных на 1 – 12, 14 и 24 сутки наблюдения в дозах 180 – 240 мг/кг и у самцов в дозах 200 – 300 мг/кг, на фоне ярко выраженных сосудистых нарушений и гастроинтестинальной токсичности. На 3 – 5 сутки после введения препарата в высоких дозах и перед гибелью у мышей отмечались: пилоэрекция, учащенное дыхание, сужение глазных щелей. У мышей самок и самцов, получавших ЛЛФО во всех дозах, отмечено дозозависимое снижение массы тела по сравнению с изменениями массы тела контрольных групп, начиная с 3 суток и до конца опыта с тенденцией к восстановлению массы тела к 30 суткам наблюдения. Расчетные токсические дозы ЛЛФО для мышей самцов: ЛД<sub>10</sub>=193 мг/кг, ЛД<sub>50</sub>=213 (199÷226) мг/кг; для мышей самок ЛД<sub>10</sub>=169 мг/кг, ЛД<sub>50</sub>=192 (181÷206) мг/кг. При изучении «острой» токсичности ЛЛФО на крысах отмечалась гибель животных на 2 – 15 сутки наблюдения после введения препарата в дозах 200 – 300 мг/кг на фоне ярко выраженных сосудистых нарушений и гастроинтестинальной токсичности. На 3 – 5 сутки после введения препарата в высоких дозах и перед гибелью у крыс отмечалось: пилоэрекция, учащенное дыхание, сужение глазных щелей, кровавистые выделения из глаз и носа, диарея с кровью. У крыс самок и самцов, получавших ЛЛФО в дозах 120 – 180 мг/кг, резкого снижения массы тела не наблюдалось, однако в дозах 200 – 300 мг/кг отмечено резкое дозозависимое снижение массы тела по сравнению с изменениями массы тела контрольных групп, начиная с 3 суток и до конца наблюдения. Расчетные токсические дозы ЛЛФО при однократном внутривенном введении для крыс самцов: ЛД<sub>10</sub>=189 мг/кг, ЛД<sub>50</sub>=206(195÷215) мг/кг; для крыс самок ЛД<sub>10</sub>=172 мг/кг, ЛД<sub>50</sub>=200(191÷209) мг/кг.

**Заключение.** Полученные результаты по изучению «острой» токсичности ЛЛФО позволяют рекомендовать его для дальнейшего изучения.

*Х.М. Швед, О.В. Кеца, И.А. Шмараков*

#### **ВЛИЯНИЕ $\omega$ -3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ В МИКРОСОМНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ**

*Черновицкий национальный университет им. Ю. Федьковича, Черновцы, Украина*

**Актуальность.** Развитие в организме злокачественного новообразования сопровождается усиленным продуцированием токсических веществ, основная часть которых обезвреживается печенью. Ведущую роль в детоксикации этих веществ играет глутатион-S-трансфераза (GST), исследование активности которой на разных стадиях онкогенеза может служить критерием генотоксического действия продуктов метаболизма опухоли на отдаленные органы. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) могут проявлять гепатопротекторные свойства в условиях онкогенеза.

**Цель работы.** Изучение активности GST в микросомной фракции печени крыс с трансплантированной карциномой Герена в условиях введения  $\omega$ -3 ПНЖК. В работе использовались самки беспородных крыс. Животных разделили на 2 группы: I – крысы с трансплантированной карциномой Герена; II – крысы с карциномой Герена, трансплантированной на фоне предварительного восьминедельного введения  $\omega$ -3 ПНЖК в дозе 120 мг/кг.

**Результаты** проведенных исследований показали, что по мере роста в организме карциномы Герена снижается активность микросомной GST – энзима II фазы биотрансформации ксенобиотиков, с минимальными значениями в стационарную фазу онкогенеза (21 сутки после трансплантации опухоли). Вероятно, интенсивное накопление продуктов метаболизма опухоли превышает возможности клеточной системы детоксикации печени. Предварительное введение  $\omega$ -3 ПНЖК приводит к повышению активности GST в микросомной фракции печени крыс в логарифмическую фазу онкогенеза (14 сутки после трансплантации опухоли), что может быть ответом на образование продуктов свободнорадикального окисления. Катализируя реакции нуклеофильного присоединения тиольной группы глутатиона к электрофильному центру субстрата, GST обеспечивает локальную защиту клеток печени крыс-опухоленосителей.

**Заключение.** Таким образом, применение  $\omega$ -3 ПНЖК в комбинации с противоопухолевыми препаратами может повысить противоопухолевый эффект и снизить гепатотоксичность последних.

*В.М. Шелепова, З.Г. Кадагидзе, Е.В. Калининцева*

#### **ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ROMA В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ**

ФГБНУ «РОИЦ им.Н.Н.Блохина», Москва

**Актуальность.** Опухолевые образования яичников диагностируются более чем у 20 % женщин. Надежных методов, позволяющих распознать природу опухоли до операции, не существует. В маркерной диагностике в этих целях используется показатель ROMA (алгоритм риска рака яичников (РЯ)), расчет которого основан на измерении двух маркеров (ОМ) – СА125 и HE4 – с учетом статуса менопаузы. При дискриминационном уровне (ДУ) 11,4 % (пременопауза) и 29,9 % (постменопауза) чувствительность ROMA в выявлении РЯ составляет по разным данным 83 – 94 %. При этом специфичность недостаточно высока: каждая четвертая женщина с доброкачественным образованием (ДОЯ) попадает в группу высокого риска по РЯ.

В задачу работы входило оптимизировать ROMA с целью повышения его диагностической специфичности. **Материалы и методы.** СА125 и HE4 определяли в сыворотках, полученных от 242 женщин: здоровые доноры (n=47), пациентки с ДОЯ (n=86), больные РЯ (n=109). Концентрация ОМ измерялась на автоматическом анализаторе ELECSYS 2010 (Hoffmann-La Roche) с использованием реагентов этого же производителя.

**Результаты.** Поправки ROMA касались вычисления прогностического индекса (PI). Оптимизированные нами формулы (ROMA-РОИЦ) позволили значительно повысить специфичность (до 97,7 %). Показано, что использование формул для вычисления ROMA-РОИЦ равнозначно повышению ДУ ROMA приблизительно в 2 раза. Иными словами, вычисление новых формул проще заменить новыми ДУ, причем этот прием оказался рациональным только для статуса «пременопауза», где значения ROMA ниже 11,4 % ассоциировались с ДОЯ (ОПП 93,9 %); выше 22 % – с РЯ (ППП 97,5 %); все пациентки с показателями ROMA в диапазоне 11,4 – 22,0 % («серая зона») нуждаются в дополнительном обследовании. У пациенток в постменопаузе ДУ остается прежним – 29,9 %.

**Выводы.** Использование одновременно двух подходов (ROMA и ROMA-РОИЦ) позволяет повысить эффективность дифференциальной диагностики образований яичников, главным образом, за счет пациенток в пременопаузе. Результаты носят предварительный характер.

Е.А. Шестакова, Е.А. Дудко, М.В. Родионова, А.В. Гришанина, Р.Ю. Раманаускайте, Т.А. Богуш

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ПРОГЕСТЕРОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ТКАНИ РАКА ЯИЧНИКА И РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** В настоящее время растет интерес к гормонотерапии, являющейся золотым стандартом адъювантного лечения рака молочной железы (РМЖ). В частности, показана эффективность антиэстрогенов и ингибиторов ароматазы в лечении рака яичника (РЯ). В настоящем исследовании для определения перспектив гормональной терапии РЯ в ткани опухолей этой локализации в сравнении с РМЖ проведена количественная оценка прогестероновых рецепторов (ПР), экспрессия которых является предиктивным маркером эффективности антиэстрогеновой терапии.

**Материалы и методы.** Иммунофлуоресцентная оценка экспрессии ПР проведена в 52 хирургических образцах РЯ и РМЖ с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Суспензии клеток опухоли инкубировали с первичными антителами (PgR636, ДАКО) в течение ночи и 1,5 часа со вторичными антителами (ab98729). Показатели экспрессии ПР анализировали с помощью программы FlowJo статистическим методом Колмогорова-Смирнова. Уровень экспрессии ПР – количество специфически флуоресцирующих клеток относительно общего количества: высокий – количество специфически окрашенных клеток в опухоли  $\geq 30$  %, умеренный –  $< 30$  %.

**Результаты.** 1. Экспрессия ПР идентифицирована в большинстве образцов РМЖ (82 %) и РЯ (70 %) с более низким средним уровнем экспрессии ПР в ткани РЯ, чем РМЖ ( $23,0 \pm 11,9$  % и  $30,1 \pm 14,1$  %,  $p=0,056$ ). 2. Число случаев с умеренным уровнем экспрессии ПР было выше в ткани РЯ, чем РМЖ (76 % и 50 %), а с высоким – ниже в ткани РЯ по сравнению с РМЖ (24 % и 50 %). 3. Различий в средних показателях уровня экспрессии ПР в ткани РЯ и РМЖ для групп с умеренной ( $21,5 \pm 4,6$  % и  $24,4 \pm 4,1$  %,  $p=0,1$ ) и высокой ( $45,0 \pm 5,2$  % и  $43,6 \pm 10,6$  %,  $p=0,7$ ) экспрессией ПР не выявлено.

**Выводы.** Результаты оценки экспрессии прогестероновых рецепторов в ткани рака яичников свидетельствуют о возможности эффективного применения антиэстрогеновой терапии у значительного числа пациентов, но меньшего, по сравнению с раком молочной железы.

Исследование поддержано грантами РФФИ (№№ 13-04-01004-а, 15-04-06991-а, 14-04-31734-мол-а) и ФИМТ-2014-205.

И.П. Шилов<sup>1</sup>, А.И. Панас<sup>1</sup>, А.С. Рябов<sup>1</sup>, Е.П. Новичихин<sup>1</sup>, К.С. Шамхалов<sup>1</sup>, А.В. Иванов<sup>2</sup>

### ПОРТАТИВНЫЙ ЛАЗЕРНО-ВОЛОКОННЫЙ ФЛУОРИМЕТР ИК-ДИАПАЗОНА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОЖНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

<sup>1</sup>ФГБУН «ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН, Фрязинский филиал», Фрязино  
ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** Известно, что иттербиевый комплекс 2,4-диметоксигематопорфирина IX (ИКДГ) является перспективным маркером люминесцентной диагностики (ЛД) различных форм новообразований, поскольку он обладает характерной для порфиринов туморотропностью, не фототоксичен и люминесцирует в ближнем ИК-диапазоне спектра 800 – 1100 нм, находящемся в «окне прозрачности» биотканей.

**Цель работы.** Создание и апробация портативного лазерно-волоконного флуориметра (ЛВФ) ИК-диапазона для исследования заболеваний кожи и слизистых оболочек.

**Материалы и методы.** В качестве диагностикума для изучения поражений кожи и слизистых использовали фармацевтическую композицию (ФК) на основе ИКДГ. Исследования люминесцентного диагностического контрастного индекса новообразование/норма (ЛДКИ) при воспалительных и пролиферативных процессах с применением разработанного ЛВФ осуществлялись в ФГБУ «ГНЦ Лазерной Медицины ФМБА РФ» на пациентах-волонтерах с различными поражениями кожи (гемангиома, невус, кератома, экзема и т.д.). **Результаты.** Для данного спектрального диапазона был разработан и изготовлен опытный образец ЛВФ повышенной чувствительности для исследования заболеваний кожи. ЛВФ состоит из следующих основных элементов: 405нм-полупроводниковый лазер, волоконно-оптический зонд (ВОЗ) повышенной механической прочности, блок отражающих интерференционных фильтров, фотодиодный блок с усилителем, аналогово-цифровой преобразователь (АЦП), ноутбук с разработанной программой. В процессе исследования дистальный конец 13-жильного ВОЗ устанавливался вблизи поверхности кожного покрова, включался 405нм-полупроводниковый лазер с оптической мощностью на дистальном конце до 10мВт. ИК-люминесцентный сигнал ИКДГ выделялся блоком отражательных интерференционных фильтров и поступал на фотодиодный блок с усилителем. После усиления и оцифровки с помощью АЦП сигнал воспринимался на ноутбуке в виде временного профиля интегральной интенсивности люминесценции от каждой изучаемой зоны. В процессе исследований было показано, что по истечении 40 мин после обработки кожного покрова данной ФК измеренный ЛДКИ составил 2,5 – 5,0 в зависимости от типа кожного повреждения и концентрации ИКДГ в ФК.

**Заключение.** Разработанный портативный ЛВФ ИК-диапазона обеспечивает достижение высоких значений ЛДКИ, что позволяет с повышенной точностью определять границы распространенности поражений кожи, изучать накопление ИКДГ при воспалительных и пролиферативных процессах с целью выявления их отличий от раковых заболеваний, контролировать изменение накопления ИКДГ в процессе лечения.

Т.Г. Шкаврова, Г.Ф. Михайлова, Е.В. Голуб, В.В. Цепенко, В.В. Павлов

#### **ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск

**Цель исследования.** Изучить динамику цитогенетических нарушений у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ).

**Задачи исследования.** Провести цитогенетический мониторинг эффективности проводимой терапии, изучить динамику выявленных нарушений в постклиническом периоде.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на образцах периферической крови больных ХЛЛ методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH). От 2 до 5 раз на протяжении 2 – 67 месяцев были обследованы 20 пациентов. В работе использован коммерческий набор молекулярных зондов (Vysis, USA) для выявления делеций 17p13 (ген p53), 11q22 (ген ATM), 13q14 (ген Rb1), 13q34 и трисомии хромосомы 12.

**Результаты.** Выявлено, что после проводимой терапии частота маркерных aberrаций хромосом, как правило, значительно снижалась, но, спустя некоторое время (9 – 12 месяцев), она возрастала до первоначального уровня. У 4 больных ХЛЛ, не нуждающихся в терапии, частота маркерных aberrаций оставалась на одном уровне.

**Выводы.** Проведение динамического цитогенетического наблюдения за больными подтверждает его практическую значимость, а также может внести ценный вклад в понимание патогенеза ХЛЛ.

И.Ж. Шубина, Ю.А. Борисова, Г.Б. Смирнова, М.В. Киселевский, Е.М. Трецалина, З.С. Шпрах

#### **ДИССЕМИНАЦИЯ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ CA755 В КОСТНЫЙ МОЗГ МЫШЕЙ НА ФОНЕ СЕЛЕКТИВНЫХ МОДИФИКАТОРОВ**

**ЭСТРОГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ (СМЭР)**

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

**Актуальность.** Эссенциально связанные с эстрогенами цитокератины СК19 в периферической крови и костном мозге (КМ) являются маркерами циркулирующих и диссеминированных опухолевых клеток (ЦОК, ДОК) при раке молочной железы и свидетельствуют о минимальной резидуальной болезни. СМЭР в определенных дозах выступают как эстрогены и, соответственно, могут быть промоторами опухолевой диссеминации.

**Материалы и методы.** Использованы эсторгензависимая мышьяная аденокарцинома молочной железы Ca755 из Коллекции РОНЦ на мышцах-самках BDF<sub>1</sub>, разделенных на 3 группы (n=17). Часть мышей не получала лечения и взята для контроля роста опухоли (гр.1). СМЭР: пероральные тамоксифен (Там) (гр.2) и секоизоларицирезинол (СЕКО) (гр.3) вводили 10-дневным курсом в оптимальных ингибирующих рост опухоли дозах. На сутки, соответствующие окончанию курса СМЭР, у всех мышей забирали периферическую кровь и клетки КМ, которые окрашивали моноклональными антителами против СК19 («Dako», USA). Подсчет СК19+ клеток выполняли с помощью флуоресцентной и световой микроскопии методами проточной цитометрии и иммунофлуоресцентной спектроскопии с использованием программы WinMDI 2.8. по средней геометрической интенсивности флуоресценции клеток GeoMean (geometrical mean fluorescence intensity) с разбросом и коэффициентом вариации CV.

**Результаты.** Показано, что после применения СМЭР в образцах крови 1 – 3 групп все показатели были сходными GeoMean(±SD): 31,94±5,02; 28,87±13,7; 28,02±9,50 и CV(±SD) 24,74±2,60; 17,76±1,51; 20,11±0,22, соответственно. Та же картина получена в образцах КМ: GeoMean(±SD) 30,14 ± 2,33; 39,07±2,30; 32,48±3,75 и CV(±SD) 16,57±1,8; 19,29±0,54; 17,05±1,05, соответственно. Иммунофлуоресцентный анализ позволил выявить в костном мозге единичные СК19+ клетки у всех групп мышей с привитой опухолью.

**Заключение.** Цитологическая верификация единичных клеток Ca755, экспрессирующих эпителиальный маркер СК19 в костном мозге и крови всех групп мышей, а также иммунофлуоресцентный анализ СК19+ клеток позволили выявить отсутствие стимуляции диссеминации эстрогензависимой опухоли в костный мозг под действием СМЭР (тамоксифен или СЭКО).

Н.А. Шуканова<sup>1</sup>, Н.А. Козловская<sup>2</sup>, М.А. Мартынова<sup>1</sup>, Е.В. Шаповал<sup>2</sup>, И.М. Бушмакина<sup>1</sup>, М.М. Молчан<sup>1</sup>**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ В КРОВИ ПАЦИЕНТОК С ДИАГНОЗОМ ФИБРОАДЕНОМА И РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ЦЕЛЬЮ МОНИТОРИНГА ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА**<sup>1</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь<sup>2</sup>РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, Минск, Беларусь

**Задачи исследования.** Разработка дополнительного метода мониторинга и прогнозирования течения фиброаденомы (ФАД) и рака молочной железы (РМЖ) с использованием сравнительного анализа активности холинэстераз (ХЭ) в крови пациенток.

**Материалы и методы.** Активность ХЭ в микроколичествах крови пациенток определяли стандартным методом с использованием реактива Элмана в присутствии ингибитора бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) iso-ОМРА или ингибитора ацетилхолинэстеразы (АХЭ) BW284c51. Активность ХЭ выражали в относительных единицах увеличения оптической плотности суспензии разведенной в 1000 раз крови ( $\lambda = 436$  нм) в минуту в пересчете на величину, отражающую содержание гемоглобина в крови и полученную гемихромным методом с использованием 0,06% раствора додецилсульфата натрия в фосфатном буфере.

**Результаты и выводы.** Определены значения активности ХЭ в крови 37 пациенток с первично верифицированным диагнозом РМЖ и 27 пациенток с диагнозом ФАД. Для всех злокачественных опухолей определены молекулярно-генетические подтипы РМЖ: люминальный А, люминальный Б, Her2-позитивный и трижды-негативный. Установлено, что активность БуХЭ в крови пациенток с диагнозом ФАД существенно меньше активности этого фермента в крови пациенток с диагнозом РМЖ всех четырех подтипов с уровнем значимости  $P < 0,001$ . Активность АХЭ в крови пациенток с диагнозом ФАД также ниже, чем в крови пациенток с диагнозом РМЖ, но уровень значимости составляет 0,1-0,05, что свидетельствует только о тенденции уменьшения активности. Следует отметить, что определение активности ХЭ в крови давно используют при мониторинге риска постоянного или случайного воздействия токсичных фосфорорганических соединений, для контроля успешности лечения детей с острым лимфобластным лейкозом. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о возможности использования дешевого и доступного метода для отслеживания трансформации доброкачественной фиброаденомы в злокачественные формы опухоли молочной железы и дополнительного контроля успешности лечения РМЖ.

Н.М. Шумилова<sup>1</sup>, И.П. Шилов<sup>2</sup>, А.С. Рябов<sup>2</sup>, В.Д. Румянцева<sup>3</sup>, Ю.В. Алексеев<sup>1</sup>, А.В. Иванов<sup>4</sup>**НАКОПЛЕНИЕ ИТТЕРБИЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ В ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ТКАНЯХ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК**

<sup>1</sup>ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА», Москва

<sup>2</sup>ФГБУН «ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН, Фрязинский филиал», Фрязино

<sup>3</sup>МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>4</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина», Москва

**Цель исследования.** Изучить возможность селективного накопления иттербиевых комплексов порфиринов (ИКП) на основе фармацевтических композиций для наружного применения с помощью определения интенсивности флуоресценции в тканях.

**Материалы и методы.** Фармацевтические композиции с 0,05% раствором амфифильного комплекса Yb-2,4-диметоксигематопорфирина IX для наружного нанесения на кожу и слизистые оболочки. Макетный вариант лазерно-волоконного флуориметра (ЛВФ), диапазон измерения 900 – 1100 нм. Больные – волонтеры с дисгидротической экземой, розацеа, acne vulgaris, гемангиомами, себорейными кератомами, вульвовагинитом. Препараты наносились на участки патологически измененных кожи и слизистых однократно в небольших количествах. Время экспозиции 40 мин., остатки препарата удалялись 30%-ным спиртовым раствором. Флуоресценция возбуждалась излучением 405 нм, результаты измерений обрабатывались специальной компьютерной программой с построением графиков.

**Результаты.** Установлено, что фоновые показатели здоровых тканей без нанесения ИКП составляли от 0,12 до 0,25 Относительных единиц (ОЕ). После нанесения препарата на кожу на 40-й мин. интенсивность флуоресценции – от 2,4 до 3 ОЕ. С течением времени интенсивность флуоресценции носила параболический характер с возвращением к исходному уровню через 120 мин. При дисгидротической экземе на 40-й мин. измерения интенсивность флуоресценции составляла 6,5 ОЕ. При розацеа (папуло-пустулезная форма) и acne vulgaris в воспалительной папуле от 5,5 до 8,1 ОЕ, эритематозных очагах – 5,4 ОЕ, пустулах – 8,2 ОЕ. В гемангиомах – 7,2 ОЕ, себорейных кератомах от 7,0 до 15,2 ОЕ, вульвовагинитах с эрозиями от 4,4 до 17 ОЕ (в местах эрозии). В процессе лечения показатели возвращались к исходным значениям.

**Выводы.** Наружное нанесение ИКП и измерение флуоресценции в ИК-диапазоне показывает существенное их накопление в местах измененной кожи и слизистых оболочек по сравнению со здоровыми тканями. Предполагается, что при наборе достаточного клинического материала будут выявлены пороговые значения флуоресценции для здоровых и измененных тканей в зависимости от нозологических форм заболеваний, стадии, выраженности процесса и его локализации, что позволит осуществлять дифференциальную диагностику и контроль за эффективностью проводимой терапии.

*Т.Г. Шутова, Ж.В. Игнатович*

#### **НАНОКАПСУЛЫ С ВОДОРАСТВОРИМЫМИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

*ИХНМ НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Коллоидно-устойчивые нанокapsулы со структурой ядро/оболочка перспективны для создания новых инъекционных форм противоопухолевых препаратов. Полисахаридное гелевое ядро обеспечивает высокую степень включения водорастворимых соединений, а мультислойная оболочка на основе модифицированных полиэтиленгликолем биополимеров – высокую коллоидную устойчивость частиц и резистентность поверхности к адсорбции белков.

На основе привитых сополимеров хитозана и полиэтиленгликоля (Хит-*g*-ПЭГ) получены капсулы диаметром менее 250 нм с мультислойной оболочкой (Хит-*g*-ПЭГ/декстран сульфат)<sub>n</sub> и ядром пектината кальция. Использование сополимера с заданной длиной основной (18 кДа) и боковых (1,6 кДа) цепей и степенью прививки *g* = 6-21 позволяет получить устойчивые дисперсии наночастиц методом послойной сборки без промежуточной отмывки.

При адсорбции в нанокapsулы водорастворимые соединения с противоопухолевой активностью, иматиниб метансульфонат (I) и его аналог 4-(морфолинometил)-N-{2-метил-5-[4-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-иламино] фенил}бензамида метансульфонат (II), замещают кальций в геле полисахарида. Массовая доля I и II в ядре нанокapsул зависит от концентрации субстанции в растворе и максимально достигает 0,3 г/г с.в. Высвобождение соединений из нанокapsул носит пролонгированный характер. При этом частицы пектината кальция без оболочки медленно набухают и разрушаются. В зависимости от температуры, в течение 1 ч высвобождается от 30 до 60 % включенного соединения. При 37 °С в среде RPMI-1640 80 % соединения высвобождается в течение 3 – 6 ч, а 100 % – в течение 24 ч. Пролонгированное высвобождение Иматиниба объясняет более высокую активность наночастиц с I в опытах на клеточной линии K562 миелоидного лейкоза, по сравнению с раствором I.

Пленки (Хит-*g*-ПЭГ/декстрансульфат)<sub>n</sub> проявляют высокую резистентность к адсорбции белков эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Методом кварцевого микровзвешивания показано, что с увеличением длины привитого полиэтиленгликоля и числа слоев в пленке адсорбция белков ЭТС на ее поверхности уменьшается. Покрытие, содержащие более 5,5 бислоев Хит-*g*-ПЭГ/декстрансульфат, полностью ингибируют адсорбцию белков.

*С.Н. Щаева*

#### **ХИРУРГИЧЕСКАЯ ТАКТИКА ПРИ МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ, ОСЛОЖНЕННОМ ОБТУРАЦИОННОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТЬЮ.**

ГБОУ ВПО СГМА, Смоленск

**Цель исследования.** Оценить результаты оперативных вмешательств при местнораспространенном колоректальном раке, осложненном обтурационной кишечной непроходимостью.

**Материалы и методы:** изучены результаты лечения 549 больных с местнораспространенным раком толстой кишки, осложненным обтурационной непроходимостью. Лечение проводилось в стационарах Смоленска и Смоленской области за период 2001 по 2012 гг. Средний возраст больных составил  $62 \pm 1,5$ . Из них 187 пациентам выполнены радикальные одноэтапные хирургические вмешательства, 152 многоэтапные; 87 больным циторедуктивные и 123 пациентам симптоматические операции.

**Результаты.** Хирургические вмешательства на толстой кишке комбинировали с удалением единым блоком вовлеченных в опухолевый процесс органов и тканей. Инвазия злокачественной опухоли у женщин наиболее часто наблюдалась в тонкую кишку, брыжейку и другие отделы толстой кишки, в женские половые органы. При гистологическом исследовании послеоперационных макропрепаратов истинное прорастание опухоли в соседние органы и ткани подтверждено 84,1 % случаев. В остальных наблюдениях 15,9 % опухолевое прорастание в рядом расположенные органы имело характер перифокального воспаления ( $p < 0,05$ ). Больше количество симптоматических операций было произведено пациентам в тяжелом и крайне тяжелом состояниях. Наиболее распространенной гистологической формой злокачественного новообразования толстой кишки была аденокарцинома у 94,4 % ( $n=518$ ). Чаще наблюдалась средняя и низкая степень дифференцировки (соответственно в 32,9 % и 53,3 %). Из осложнений отмечались нагноение послеоперационной раны – 24 случая (4,4 %), пневмония 16 (2,9 %) и несостоятельность анастомоза  $n=15$  (2,7 %). Летальность составила 1,6 % ( $n=9$ ) в раннем послеоперационном периоде, с преобладанием в группе с радикальными одноэтапными операциями.

**Выводы:** 1) при местнораспространенном раке толстой кишки, осложненном кишечной непроходимостью показаны комбинированные операции; 2) летальность после комбинированных оперативных вмешательств достоверно не отличается от стандартных операций.

Г.М. Юсубалиева<sup>1,2</sup>, А.В. Леопольд<sup>2</sup>, А.В. Левинкий<sup>2</sup>, В.П. Баклаушев<sup>2</sup>, П.А. Мельников<sup>2</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>4</sup>, С.А. Савельева<sup>3</sup>, М.А. Холодцова<sup>3</sup>, В.Б. Лощенов<sup>3</sup>, А.А. Потапов<sup>5</sup>, В.П. Чехонин<sup>1,2</sup>

#### ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА ГРАНИЦ ОПУХОЛЕВОЙ ИНВАЗИИ С ПОМОЩЬЮ КОНЬЮГАТА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИ-CX43 АНТИТЕЛ С ПРОИЗВОДНЫМ ФТАЛОСЕНСА

<sup>1</sup>ФГБУ «ФМИЦПН» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

<sup>3</sup>ФБГУ «Институт общей физики имени А.М. Прохорова» РАН, Москва

<sup>4</sup>Государственный научный центр «НИИПИК», Москва

<sup>5</sup>НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва

**Актуальность.** Точное определение границ опухолевой инвазии занимает значительную нишу в современной нейрохирургии глиом (Tréhin R et al, 2006). Невекторизованные фотосенсибилизаторы не обладают таргетной направленностью к мигрирующим глиомным клеткам перитуморальной зоны. Антитела, полученные к конъюгату 43 (MabE2Cx43), способны в них накапливаться [Baklaushev V.P. et al., 2009; Yusubaliev G.M. et al, 2012].

**Цель исследования.** Оценить применение конъюгата рекомбинантных антител Cx43 с производным фталосенса в интраоперационной диагностике границ глиомной инвазии.

**Материалы и методы.** Манипуляции на крысах с 12-дневной глиомой С6 проводились в соответствии с требованиями GLP. Доступ к головному мозгу крыс выполняли методом резекционной трепанации черепа в лобно-теменных областях. Для интраоперационной диагностики использовалась ЛЭСА-01-БИОСПЕК.

**Результаты.** Были аплифицированы гены, кодирующие вариабельные домены лёгкой и тяжёлой цепей MabE2Cx43, очищены рекомбинантные Fab Cx43 из лизата *E.coli* методом металлоаффинной хроматографии. Присоединение производного фталосенса к FabCx43 проводили в присутствии водорастворимого хлоргидрата 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида, освобождались от несвязавшихся компонентов методом геля фильтрации на Сефадекс G-25 в PBS (pH 6,0). Иммунохимическим методом оценивали биологическую активность конъюгата. После внутривенного введения конъюгата при спектральном анализе глиомы и периглиомной зоны крыс был зафиксирован высокий флуоресцентный сигнал в зоне экспрессии Cx43 по периферии глиомы.

**Выводы.** Оптическая визуализация флуоресцирующей перитуморальной зоны в режиме реального времени продемонстрировала перспективность векторизованных FabCx43 фотосенсибилизаторов для интраоперационной навигации в нейрохирургии глиом.

Н.П. Яворская, И.С. Голубева, В.А. Ерёмкина, Н.И. Тихонова, Л.А. Медведева, Т.Д. Миникер,

Л.В. Эктова, М.В. Дмитриева, Е.В. Санарова.

#### ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ИНДОЛО[2,3-А]КАРБАЗОЛОВ

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

**Актуальность.** Данная работа является продолжением исследований по синтезу и изучению противоопухолевой активности производных N-гликозидов индолокарбазолов. Известно, что соединения этого класса обладают биологической активностью, в том числе противоопухолевой. В работе изучались соединения с различными заместителями по имидному атому азота, включая атом водорода, amino-, гидроксизтил-, пиколиноил-, никотиноил-, изоникотиноил-аминогруппы, и разными углеводными остатками (D-галактозы, D-ксилозы, D-рибозы и L-арабинозы).

**Цель исследования.** Поиск высокоэффективного противоопухолевого соединения с широким спектром действия.

**Материалы и методы.** Противоопухолевую активность (п/а) соединений изучали на перевиваемых опухолях мышей: лимфоидной лейкемии P388, асцитной опухоли Эрлиха, эпидермоидной карциноме лёгкого LLC, раке шейки матки РШМ-5, меланоме В-16, аденокарциноме молочной железы АК-755, раке толстого кишечника АКАТОЛ. В опытах использовали мышей СВА, BALb/c, гибридов BDF<sub>1</sub>. Критерии эффективности: % торможения роста опухоли (ТРО), % увеличения продолжительности жизни животных (УПЖ). Соединения вводили внутривентриально в течение 5 дней в терапевтических дозах с использованием в растворе ДМСО, а также в лекарственной форме, в которой в качестве солюбилизатора использовался коллидон (Kollidon 17PF).

**Результаты и выводы.** Все изученные соединения обладали цитотоксической активностью. Из 25 соединений 16 проявили противоопухолевую активность на асцитных моделях с УПЖ от 86 до 347 %, 9 соединений показали непосредственный эффект до 8-го дня по окончании лечения, 8 соединений проявили значительную активность на моделях солидных опухолей с сохранением значимого ТРО от 59 до 69 % от 16 до 25 дней по окончании лечения. Отобраны четыре соединения для более детального изучения, из них высокую активность на солидных моделях проявило одно соединение с УПЖ 33 % и ТРО 57 – 90 %.

Д.М. Ягудиев<sup>1</sup>, В.А. Енгай<sup>2</sup>, А.С. Алферов<sup>3</sup>, Д.Р. Айвазян<sup>3</sup>, В.А. Пурхванидзе<sup>4</sup>

#### ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ, КАК ОРГАНСОХРАНЯЮЩИЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПОЛОВОГО ЧЛЕНА

<sup>1</sup>ФГБУ УНМЦ УД Президента РФ, Москва

<sup>2</sup>ГБУЗ ГКБ 51 ДЗМ, Москва

<sup>3</sup>ФМБА ГНЦ лазерной медицины МЗ РФ, Москва

<sup>4</sup>МЦВТ «Лазервита», Москва

**Введение.** В России рак полового члена (РПЧ) не превышает 2 % в структуре онкологических заболеваний. До настоящего времени основным методом лечения РПЧ остаётся оперативный, который является не только калечащим методом, но и сильным психотравмирующим фактором. Выполнение органосохраняющих операций при раке полового члена сопряжено с более высокой частотой развития местных рецидивов. В связи с этим, постоянно ведётся поиск новых методов лечения, способных не только сохранить орган и его функциональные способности, но и свести к минимуму риск рецидивирования опухоли. Одним из таких методов является фотодинамическая терапия (ФДТ), хорошо зарекомендовавшая себя в лечении злокачественных новообразований других локализаций.

**Цель работы.** Определение эффективности и безопасности фотодинамической терапии рака полового члена.

**Материалы и методы.** Нами была проведена ФДТ трём пациентам с неинвазивным плоскоклеточным раком полового члена. Использовался фотосенсибилизатор (ФС) Фотодитазин. Способ введения – внутривенно, доза – 0,8-1,2 мг/кг, лекарственно-световой интервал – 2 – 3 часа. Удельная доза световой энергии составила 300 Дж/см<sup>2</sup>. После ФДТ отмечалась полная резорбция опухоли с отличным косметическим эффектом. При цитологическом исследовании атипичные клетки не были обнаружены.

**Заключение.** ФДТ является щадящим, органосохраняющим и высокоэффективным методом лечения рака полового члена, позволяющим не только избавить пациента от опухоли, но и сохранить анатомо-функциональную целостность органа.

М.Н. Якунина<sup>1</sup>, Г.Б. Смирнова<sup>1</sup>, Ю.А. Борисова<sup>1</sup>, М.С. Калишьян<sup>1</sup>, Е.М. Трещалина<sup>1</sup>, М.О. Антар<sup>2</sup>

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ НОВОЙ СХЕМЫ ДОКСОРУБИЦИН + ГЕМЦИТАБИН ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

**СПОНТАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОШЕК**<sup>1</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва<sup>2</sup>Ветеринарная клиника «Биоконтроль», Москва

**Актуальность.** Низкая чувствительность спонтанного местно-распространенного рака молочной железы (РМЖ) кошек к доксорубину (ДОКС) особенно в предоперационном периоде, лимитированная побочным действием, была основанием для апробации в эксперименте эффективной при РМЖ комбинации с гемцитабином (ГЕМЦ), который не имеет перекрестной с ДОКС токсичности.

**Цель работы.** Экспериментальная оценка целесообразности применения комбинации ДОКС+ГЕМЦ при неоперабельном местно-распространенном РМЖ кошек на доклинической модели.

**Материалы и методы.** Использованы мыши-самки BDF<sub>1</sub> с Ca755. В комбинации ДОКС вводили первым в однократной дозе 7,5 мг/кг, ГЕМЦ вводили вторым: 1) при неоперабельной опухоли (9 сутки роста) однократно в диапазоне 50 – 200 мг/кг для выбора суммарных доз в комбинации; 2) при раннем лечении (2 сутки роста) в суммарных дозах 100 мг/кг (30+30+40 мг/кг) и 200 мг/кг (70+70+60 мг/кг) в клинически адекватном еженедельном режиме. Об эффективности судили в сравнении с одним ДОКС и группой контроля роста опухоли (КРО) по стандартным показателям: 1) ТРО $\geq$ 50 % в динамике, ТРО=100 % после окончания считали полной ремиссией (ПР); 2) УПЖ $\geq$ 25 % в сравниваемых группах; 3) в леченых группах оценивали излечение (ПР $\geq$ 50 дней). Соотношение эффективных доз (СЭД) комбинантов использовано для возможности пересчета доз для кошек. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$  (программа Excel для Windows 2010).

**Результаты.** На неоперабельной опухоли для курсового введения ГЕМЦ в комбинации ДОКС+ГЕМЦ в качестве суммарных были выбраны хорошо переносимые эффективные дозы 100 и 200 мг/кг ТРО=85 – 92 % против ТРО=83 – 93 % для ДОКС ( $p > 0,05$ ). При раннем лечении ДОКС+ГЕМЦ лучшим был дозовый режим с высокой суммарной дозой ГЕМЦ 200 мг/кг: достигнута ПР с УПЖ=80 % против 30 % для ДОКС ( $p < 0,05$ ) (СПЖ=25,2 $\pm$ 0,4 дня в гр. КРО) и излечением 30 % мышей. СЭД=26,6 (200/7,5). Режим с дозой 100 мг/кг излечения не давал. Переносимость комбинаций была удовлетворительной.

**Заключение.** Схема ДОКС+ГЕМЦ с однократным парентеральным введением ДОКС и 3-кратным еженедельным введением ГЕМЦ при соотношении доз 26,6 приводит к полной относительно длительной ремиссии, значимо пролонгирует жизнь мышей на 80 % с частичным излечением. Это позволяет считать изучение комбинации ДОКС+ГЕМЦ целесообразным при предоперационном лечении неоперабельного местно-распространенного рака РМЖ у кошек.

*И.В. Яриева, Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева, З.С. Шпрах***ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИФЕТРИЛИНА В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ**

ФГБНУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА», МОСКВА

**Актуальность.** Цифетрилин – новый отечественный препарат, предназначенный для лечения нейроэндокринных опухолей. Для клинических исследований предлагается лекарственная форма «Цифетрилин, таблетки 6 мг».

**Цель работы.** Валидация методики количественного определения цифетрилина в лекарственном препарате.

**Материалы и методы.** Образцы лекарственной формы цифетрилина; УФ-спектроскопия, методы статистической обработки результатов.

**Результаты.** Количественное определение цифетрилина проводили спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность спиртовых растворов в наиболее интенсивном максимуме поглощения  $\lambda_{\max}$  282 $\pm$ 2 нм относительно раствора смеси вспомогательных веществ. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении цифетрилина в методику анализа ввели способ расчета по стандартному образцу, в качестве которого использовали субстанцию цифетрилина. Валидацию метода проводили по параметрам: линейность, правильность, прецизионность (точность), воспроизводимость. Обработка экспериментальных данных показала, что результаты количественного определения хорошо описываются линейной зависимостью  $y = 0,0563 \cdot x + 0,0012$ ; при этом коэффициент корреляции составляет  $r = 0,99937$  и отвечает условию  $|r| \geq 0,99$ . Оценку правильности методики проводили на модельных смесях с содержанием цифетрилина от 80 до 120 %. Точность методики оценивали по результатам анализа усредненной пробы, полученной из 20 таблеток, воспроизводимость – по результатам выполнения анализа двумя исполнителями. Стандартное отклонение, доверительный интервал определения и относительная ошибка результата, вычисленные по результатам анализа 7 проб, составили  $S = 0,107$ ;  $\Delta x = 0,10$ ;  $\varepsilon = 1,65$  % ( $P = 95$  %), соответственно. Численное значение коэффициента нормированных отклонений (коэффициента Стьюдента), рассчитанное по результатам анализа составило  $t_x = 0,46$ . Табличное значение коэффициента Стьюдента  $t(95 \%, 6) = 2,45$ , т.е.  $t_x < t(95 \%, 6)$ .

**Выводы.** Валидация показала, что предложенная методика не отягощена систематическими ошибками, обладает достаточной точностью и воспроизводимостью.

Работа выполнена при поддержке Министерства промышленности и торговли РФ в рамках Федеральной целевой программы «Фарма-2020».

*Л.В. Татьянанко, О.В. Доброхотова, А.И. Котельников, Н.А. Санина, Г.И. Козуб,**Т.А. Кондратьева, С.М. Алдошин.***ВЛИЯНИЕ СЕРО-НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА АКТИВНОСТЬ Ca<sup>2+</sup>-**



**АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ цГМФ***Институт проблем химической физики РАН, 142432, Черноголовка, Россия*

**Введение.** Известно, что  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза СР катализирует активный транспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через биологические мембраны за счет энергии гидролиза АТФ, что нарушает соотношение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутри и вне клеток и играет важную роль в процессах адгезии метастатических клеток к эндотелию капилляров, предотвращая рост метастазов. Фосфодиэстераза цГМФ (ФДЭцГМФ) расщепляет субстрат цГМФ, который участвует в важных процессах жизнедеятельности организма и определяет антиагрегационные и вазодилататорные функции организма. Нитрозильные комплексы железа – природные «депо» NO в клетках, образующиеся в реакциях эндогенного NO с активными центрами негемовых  $[\text{Fe}-2\text{S}]$  белков. Их синтетические модели используются при разработке нового поколения лекарственных препаратов.

**Цель исследования.** Изучение молекулярных механизмов влияния новых серо-нитрозильных комплексов железа на функцию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР и ФДЭцГМФ с целью отбора соединений как потенциальных лекарственных препаратов антиметастатического, антиагрегационного, антигипертензивного и вазодилататорного спектров действия.

**Результаты и выводы.** Исследовано влияние новых нейтральных нитрозильных комплексов железа общего состава  $[\text{Fe}_2(\text{L})_2(\text{NO})_4]$  с функциональными серосодержащими лигандами: L- 3-нитро-фенол-2-илом (комплекс 1), 4-нитро-фенол-2-илом (комплекс 2) и 1-метил-тетразол-5-илом (комплекс 3) на активность  $\text{Ca}^{2+}$ - АТФазы СР и ФДЭцГМФ. Показано, что комплексы 1 и 2 полностью тормозят активный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  и гидролиз АТФ, катализируемые  $\text{Ca}^{2+}$  - АТФазой СР, в 0,1 и 0,01мМ концентрациях, на (72±7)% и (52±5)% тормозят активный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  и на (18±2)% и (22±2)% ингибируют гидролиз АТФ в концентрации 0,001мМ, разобщая гидролитическую и транспортную функции фермента. Комплекс 3 на (50±5)% тормозит транспортную функцию  $\text{Ca}^{2+}$  - АТФазы СР и на (39±4)% - гидролиз АТФ в 0,1мМ концентрации. Соединения 1, 2 и 3 обратимо и неконкурентно тормозят гидролитическую функцию  $\text{Ca}^{2+}$  - АТФазы СР с  $K_i$ , равной  $2 \cdot 10^{-6}\text{M}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}\text{M}$  и  $3,3 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , соответственно. В результате установлено, что данные соединения разобщают гидролитическую и транспортную функции фермента, нарушая баланс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках, что влияет на адгезию метастатических клеток к эндотелию капилляров и на образование тромбов. Все исследованные нитрозильные комплексы железа тормозят функцию ФДЭцГМФ в 0,1 и 0,01мМ концентрациях, способствуя накоплению вторичного мессенжера метаболизма цГМФ, ответственного за антиагрегационный, антигипертензивный и вазодилататорный эффекты в живых организмах. Полученные данные позволяют предполагать, что исследованные нитрозильные комплексы железа могут рассматриваться в качестве потенциальных лекарственных средств.

*А.Ю. Рыбкин<sup>1</sup>, Д.А. Полетаева<sup>1</sup>, А.Ю. Белик<sup>2</sup>, Н.С. Горячев<sup>1</sup>, И.И. Пархоменко<sup>1</sup>, А.А. Терентьев<sup>1</sup>, П.А. Михайлов<sup>3</sup>, Е.А. Хакина<sup>1</sup>, О.А. Краева<sup>1</sup>, П.А. Трошин<sup>1</sup>, А.И. Котельников<sup>1</sup>*

**ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ДИАД ФуЛЛЕРЕН-ФЛУОРЕСЦЕИН И ФуЛЛЕРЕН-ЭОЗИН В МОДЕЛЬНОЙ СРЕДЕ И НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК HeLa***<sup>1</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия.**<sup>2</sup>Московский физико-технический институт,**<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.*

**Введение.** Производные фуллерена представляют интерес для применения с точки зрения создания новых препаратов для фотодинамической терапии, так как способны с высоким квантовым выходом (~1) переходить в триплетное состояние и эффективно генерировать синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ . Однако эффективность фотодинамического действия фуллеренов ограничивается их слабым поглощением в красной области спектра, наиболее удобной для фотодинамической терапии. Одним из путей решения данной проблемы является создание гибридных диад путем присоединения к фуллерену красителя, эффективно поглощающего в видимой области спектра.

**Цель исследования.** Определение фотодинамической активности водорастворимых поликатионной и полианионной диад фуллерен-флуоресцеин, а также полианионной диады фуллерен-эозин.

**Материалы и методы.** Водорастворимые диады и исходные полизамещенные производные фуллерена (ППФ) синтезированы в ИПХФ РАН, структура соединений доказана методами ИК- и УФ-спектроскопии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  и электроспрей масс-спектрометрии.

Фотодинамическая активность соединений оценивалась на культуре клеток HeLa по методу МТТ, а также в модельной системе с помощью красителя НСТ. Разработаны методы определения концентрации ППФ и диад в исследуемых системах методом люминесценции и методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния.

**Результаты и выводы.** Было показано, что происходит существенное усиление фотодинамической активности диад по сравнению с исходными соединениями, как в модельной среде (в 3 раза для диады фуллерен-эозин и в 9 раз для диады фуллерен-флуоресцеин), так и на культуре клеток HeLa (в 3 раза). Также было отмечено отсутствие темновой токсичности на культуре клеток HeLa как для исходных ППФ, так и для диад в действующих концентрациях вплоть до  $2 \cdot 10^{-4}$  М. Наблюдаемый эффект увеличения фотодинамической активности диад фуллерен-краситель показывает перспективность подобных гибридных диад как новых эффективных фотосенсибилизаторов для применения в фотодинамической терапии.

Исследования поддержаны Программой Президиума РАН №1 «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий» и грантом РФФИ № 14-04-31587 мол\_а.

*А.И. Котельников, А.Ю. Рыбкин, Н.С. Горячев, А.Ю. Белик, П.А. Михайлов, Е.А. Хакина, П.А. Трошин*

**ФОТОДИНАМИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНЫХ НАНОСТРУКТУР ФуЛЛЕРЕН-КРАСИТЕЛЬ**

*Институт проблем химической физики РАН, 142432, Черноголовка, Россия*

**Введение.** В медицинской практике для фотодинамической терапии широко используются производные порфиринов, фталоцианинов и хлоринов, которые при поглощении кванта света переходят в триплетное состояние, в результате чего генерируются активные формы кислорода и подавляется развитие опухолей.

В рамках проведенных исследований обнаружено, что при объединении в одну гибридную структуру красителя и фуллерена энергия возбуждения красителя эффективно передается на фуллерен, и далее с высоким выходом трансформируется в генерацию активных радикальных частиц. Это открывает возможность использовать для создания фотодинамических препаратов нового поколения красители, возбуждаемые не только в триплетное, но и в синглетное состояние. В результате значительно повышается фотодинамическая активность традиционных красителей и расширяются пути поиска новых красителей, удовлетворяющих широкому спектру разносторонних требований, предъявляемых к фотодинамическим препаратам.

**Цель исследования.** Создание высокоэффективных фотодинамических препаратов нового поколения на основе ковалентных комплексов фуллерен-краситель.

**Материалы и методы.** Разработаны научные принципы и методы создания водорастворимых ковалентных структур фуллерен-краситель, в которых поглощение красителем кванта света приводит к переносу энергии или электрона на фуллерен. Осуществлено ковалентное присоединение к производным фуллерена красителей флуоресцеина, эозина, противоопухолевого антибиотика рубоксина и других красителей. Методами стационарной и кинетической спектрофлуориметрии показано, что при возбуждении красителя в составе гибридной структуры в синглетное возбужденное состояние происходит эффективный перенос возбуждения или электрона с красителя на фуллерен, с последующей генерацией активных форм кислорода. Фотодинамическая активность гибридных структур исследовалась в водных растворах и в структуре липосом, по влиянию на ДНК и на клеточные культуры.

**Результаты и выводы.** Показано, что объединение в одну гибридную структуру красителя и фуллерена позволяет повысить фотодинамическую активность традиционных красителей в 5 – 50 раз, или использовать красители, возбуждаемые только в синглетное состояние, что значительно расширяет возможности поиска оптимальных красителей для создания высокоэффективных фотосенсибилизаторов нового поколения.

Исследования поддержаны Программой Президиума РАН №1 «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий» и грантом РФФИ №14-04-31587 мол\_а.

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АОС – антиоксидантная система	МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы
АОК – антителообразующие клетки	МЛВ – мультиламеллярные везикулы
АЛК – 5-аминолевулиновая кислота ( $\delta$ -aminolevulinic acid)	МДС – миелодиспластический синдром
АФК – активные формы кислорода	МВДП – медиана времени до прогрессирования
АЛС – антилимфоцитарная сыворотка	МИБТ – медицинские иммунобиологические препараты
АТГ – антитимоцитарный глобулин	МЛ – моноклеарные лейкоциты
АТК – аденокарцинома толстой кишки	ММ – метамиелоцит(ы)
БОВ – Большие одноламеллярные везикулы	ММР – матриксные металлопротеиназы
БПВП – базисные противовоспалительные препараты	МКА – моноклональные антитела
БКС – бинарная каталитическая система	ММ – множественная миелома
ВБН – вирус болезни Ньюкасла	МОВ – медиана общей выживаемости
ВКМ – внеклеточный матрикс	МРЛ – мелкоклеточный рак легкого
ВРПС – водорастворимые полисахариды	ММП – матриксные металлопротеиназы
ВМ – васкулогенная мимикрия	МРТ – магнитно-резонансная томография
ВЧД – внутричерепное давление	МЧРА – метилчувствительный рестриктивный анализ
ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр	НАД – никотинамидадениндинуклеотид
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография	НК – натуральные киллеры
ВЭФР-А – васкулоэндотелиальный фактор роста-А	НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
в/б – внутривенно	НО – наноболочки
в/в – внутривенно	НПТ – наилучшая поддерживающая терапия
ГДА – гистоновая деацетилаза	НСф – наносферы
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа	НСт – наностержни
ГИСО – гастроинтестинальные стромальные опухоли	НСПВС – нестероидные противовоспалительные средства
ГИБП – генно-инженерные биологические препараты	НХЛ – неходжкинская лимфома
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома	НЭ – нуклеиновый эквивалент
бГК – быстрорастущая дедифференцированная	ОбО – объективный ответ
гепатоцеллюлярная карцинома	ОДС – оптическая диффузионная спектроскопия
мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная	ОО – отсутствие ответа
карцинома	ОКТ – оптическая когерентная томография
ГПВ/GPV – гликопептидная противоопухолевая вакцина	ОЦ – окисленные целлюлозы
(glycopeptide cancer vaccine)	ОЦК – объем циркулирующей крови
ГЯФ – гепатоцитарные ядерные факторы	ОП – опухолевой плеврит
ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия	ОМ – опухолеассоциированные маркеры
предстательной железы	ОЭ – объективный эффект
Докс – Доксорубин	ПАВ – поверхностно активные вещества
ИК Докс – иммунолипосомальные конструкции с	НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества
доксорубином	ПВП – поливинилпирролидон
ДРС – динамическое рассеяние света	ПД – пролиферация и дифференцировка
ДМБА – диметил- $\alpha$ -бензантрацен	ПЖ – поджелудочная железа
ДМТ – ДНК-метилтрансферазы	ПЗ – прогрессирование заболевания
ДЛФО – теория Дерягина – Ландау – Фервея – Овербека	ПМЗО – первично-множественные злокачественные ново-
ДК – диеновые конъюгаты	образования
ДЭС – двойной электрический слой	ПО – полный ответ
ЖТ – жировая ткань	ПОПР – полиоксипропилен
ЗНО – злокачественные новообразования	ПС – плевросклерозирующие средства
ЗО – злокачественное образование	ПСА – простатический специфический антиген
ЗХВК – золотохлористоводородная кислота	ПСАсв – простатический специфический антиген,
ИДМ – иммунодефицитные мыши	свободная форма
ИДР – инфильтративный дольковый рак (МЖ)	ПСАобщ – простатический специфический
ИК – иммунолипосомальные конструкции	антиген, общая форма
ИРИ – иммунорегуляторный индекс	%ПСАсв – соотношение свободной формы ПСА
ИРО – индекс роста опухоли	к общей, выраженное в процентах
ИФА – иммуноферментный анализ	ПТПП – паратироид-подобный протеин и его рецептор (ПТПП-R1)
ИЭ – индекс эффективности	ПТПГ – паратироид-подобный гормон
ИП – импульсные последовательности	ПФОС – перфторорганические соединения
ИС – иммунная система	ППК – первичные половые клетки
ИФН- $\gamma$ – интерферон гамма	ПК – периферическая кровь
ККМ – критическая концентрация мицеллообразования	ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
КРР – колоректальный рак	ПКГШ – плоскоклеточная карцинома головы и шеи
КРО – контроль роста опухоли	ПХТ – полихимиотерапия
КЗ – коллоидное золото	ПЭГ – полиэтиленгликоль
КОИР – коэффициент ориентировочно-исследовательской	ПЯ – палочкоядерный
реакции	РМЖ – рак молочной железы
КЭР – кардиоэзофагеальный рак	МР РМЖ – местнораспространенный РМЖ
ЛТ – лучевая терапия	ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма РМЖ
ЛМ – липосомальный митоксантрон	РЭС – ретикулоэндотелиальная система
ЛЛЛФ – лиофилизированной липосомальной ЛФ	ОАА – опухолеассоциированный антиген

РА – ревматоидный артрит  
PCO – раствор стандартного образца  
PKT – рентгеновская компьютерная томография  
РЛ – рак легкого  
РМП – рак мочевого пузыря  
РМЖ – рак молочной железы  
РП – рак почки  
РПК – рак прямой кишки  
РПЖ – рак поджелудочной железы  
PCO – рабочий стандартный образец  
РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов  
РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками  
РЭС – ретикуло-эндотелиальная система  
РФ – ревматоидный фактор  
РФр – растворимые углеводные фракции  
НФр – нерастворимые углеводные фракции  
РЧА – эффективность радиочастотной абляции  
РШМ – рак шейки матки  
СВФ – стромально-васкулярная фракция  
СДЛВ – система доставки лекарственных веществ  
СИТ – специфическая иммунотерапия  
СК – селекартен  
СЗП – свежезамороженная плазма  
СО – суперинвазионный описторхоз  
СПК – суммарный полисахаридный комплекс  
СПС – сосудисто-подобные структуры  
СПЖ – средняя продолжительность жизни  
СЯ – сегментоядерный  
ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота  
ТИК – тканеинженерная конструкция  
ТИМП – тканевые ингибиторы  
ТСХ – тонкослойная хроматография  
ТФ – транскрипционные факторы  
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия  
ТЭОС – тетроэтилортосиликата  
ТЭС – телочья эмбриональная сыворотка  
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография  
ФГА – фитогемагглютинин  
ФД – флуоресцентная диагностика  
ФИЦХ – флуоресцентной иммуноцитохимии  
ФР – факторы роста  
ФС – фотосенс  
ФСБ – фосфатно-солевой буфер  
ФСП – фармакопейная статья предприятия  
ФТ – фарнезил-трансфераза  
ФТС – фетальная телочья 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

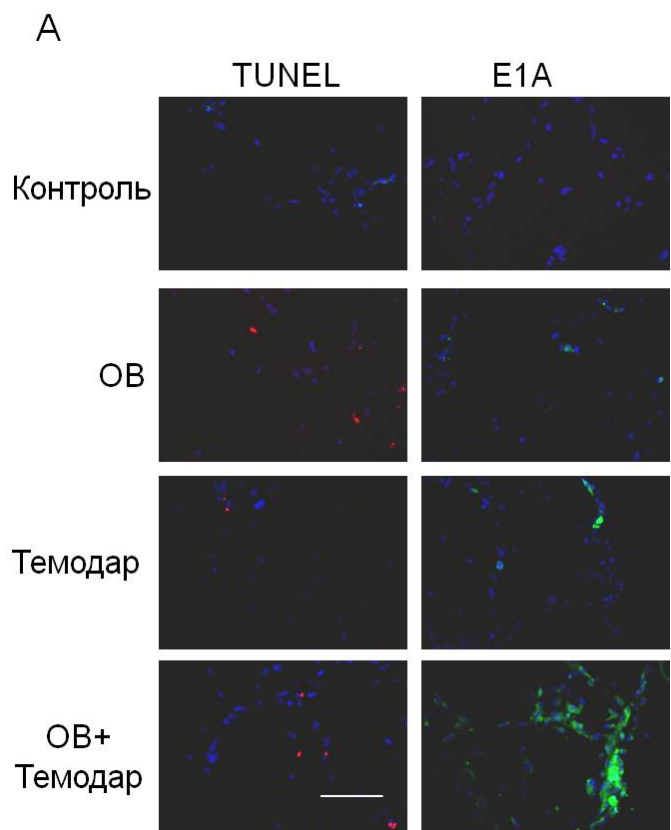
---

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  
BCRP – breast cancer resistance protein  
BDFI – bioactivity-directed fractionation and isolation  
c-Kit – рецептор фактора стволовых клеток  
CFSE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl este  
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  
FAMMM-синдром – Familial Atypical Multiple Mole Melanoma syndrome)  
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  
IBC – inflammatory breast cancer  
IC<sub>50</sub>-50% -ной ингибирующей концентрации ( )  
LDCI – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingaron  
LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюиса)  
LSIL – low-grade intraepithelial lesions  
MRP – multidrug resistance associated protein  
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  
NER – nucleotide excision repair  
NSE – нейроспецифической эналазы  
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 $\alpha$   
HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1  
HSE – heat shock elements  
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  
PTHrP – parathyroid hormone-related protein  
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  
ROS – reactive oxygen species  
SAL – sterility assurance level  
SCCA – антиген плоскоклеточной карциномы  
SDD – systems delivery drugs  
SSCP-анализ (single-strand conformation polymorphism analysis, анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма)  
TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)  
VM – vasculogenic mimicry

Рисунок к статье И.В. Уласова и соавт.

**ИНГИБИТОР КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА P53  
ПОЗИТИВНО РЕГУЛИРУЕТ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ  
ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВЕКТОРА В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ**

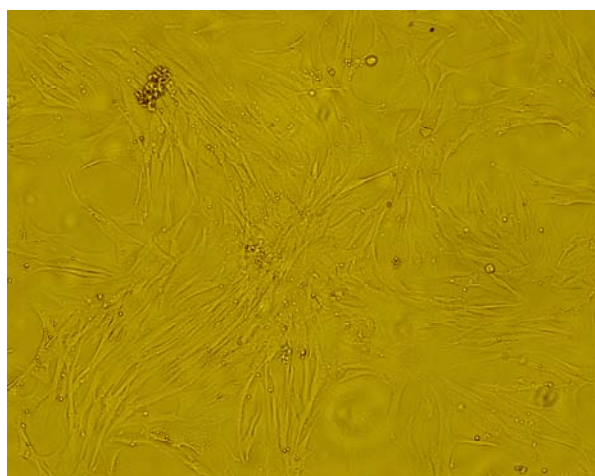


**Рис. 2.** Влияние индукции клеточного белка P53 на клеточную токсичность:

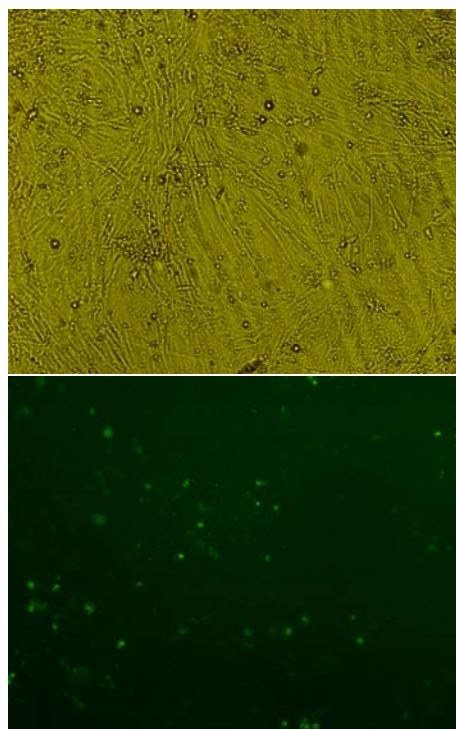
А – клетки глиомы человека U87 были инфицированы ОНВИР и через 24 ч обработаны темодалом. Общий уровень TUNEL<sup>+</sup> и FITC<sup>+</sup>-клеток представлен в графике.

Рисунок к статье А.В. Самойлова и соавт.

**ТРАНСФЕКЦИЯ *IN VITRO* ЭКЗОГЕННОЙ ДНК КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДА КУР**



**Рис. 1.** Культура клеток яйцевода.



**Рис. 2.** Трансфицированные клетки яйцевода курицы.

А – при естественном освещении.

Б – в ультрафиолетовом освещении.