

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№3 Том 11 2012 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

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

Редакционный совет

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

115478, Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Тел.: +7 (499) 323 57 00, +7 (499) 324 10 65; факс: +7 (499) 324 22 74;

E-mail: biotherapy_rbi@mail.ru

Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 6 усл.-печ. листов,
подписано в печать 31.08.2012
Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел. +7 (499) 324 24 70; ronc@list.ru

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

Принт-менеджмент:

«Практическая медицина»

Тел.: +7 (495) 981-91-03

www.medprint.ru

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>А.А. Вартамян, И.Н. Григорьева, В.С. Домбровский, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников</i> БЛОКИРОВАНИЕ NOTCH СИГНАЛЬНОГО ПУТИ СТАБИЛИЗИРУЕТ ВАСКУЛОГЕННУЮ МИМИКРИЮ ПРИ МЕЛАНОМЕ	3
<i>А.Н. Шнейдерман, А.И. Тарасова, М. С. Вагида, Е.Ю. Брагин, И.Б. Зборовская</i> ВЛИЯНИЕ НОКДАУНА ФЛОТИЛЛИНА-2 НА СВОЙСТВА КЛЕТОК ЛИНИИ H460 РАКА ЛЕГКОГО	9
<i>М.С. Чесноков, И.Ф. Кустова, Д.А. Шавочкина, А.Г. Кузнецова, Н.Л. Лазаревич</i> ЧАСТИЧНАЯ РЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПОНИЖЕНИЕ ВЫРАЖЕННОСТИ ЧЕРТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК ПРОТОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА HNF4α	17
<i>Н.В. Голубцова, Е.В. Степанова, А.Е. Бармашов, О.С. Бурова, К.А. Барышников, И.Н. Григорьева, М.А. Барышникова, М.В. Огородникова, Г.З. Чкадуа, Ю.В. Шишкин, И.Н. Михайлова, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ	25
<i>А.А. Вайнсон, В.В. Мещерикова</i> МЕТОДИКА ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ФИЛГРАСТИМА (Г-КСФ), ИНТЕРФЕРОНОВ α, β И СОМАТОТРОПИНА НА КЛЕТКАХ <i>IN VITRO</i>	29
<i>Н.И. Зимакова, Е.Ю. Колесникова, А.П. Будько, З.Г. Дейчман, А.Е. Золотарев, Г.А. Бадун, М.Г. Чернышева</i> ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ АНАЛОГА ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ГОРМОНА СОМАТОСТАТИНА (АГГ)	33
<i>Е.В. Сорокина, И.В. Манина</i> НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ НА ФОНЕ ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ВЭБ-ИНФЕКЦИИ	39
<i>А.Е. Бармашов, Г.З. Чкадуа, И.Н. Михайлова, З.А. Соколова, М.В. Огородникова, Л.Ф. Морозова, К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников</i> ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА МЕТОДОМ <i>ELISPOT</i> У БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ДЕНДРИТНОКЛЕТОЧНУЮ ВАКЦИНУ	47
<i>Д.А. Бодягин, Е.Б. Исакова, М.С. Гинс, В.М. Бухман, И.М. Лученко, М.Ю. Каган, П.Ф. Кононков, В.К. Гин</i> ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ АМАРАНТА НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ОПУХОЛИ МЫШЕЙ	53
<i>Т.Л. Юркитович, П.М. Бычковский, Н.В. Голуб, В.А. Алиновская, Р.И. Костерова, С.А. Беляев, А.А. Кладиев, С.А. Красный, Ю.П. Истомин, Е.Н. Александрова, М.Ю. Ревтович, А.И. Шмак</i> ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТИ ПОЛИМЕР-ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПРОСПИДИНА <i>IN VIVO</i> НА МОДЕЛИ САРКОМЫ М-1 И САРКОМЫ ЙЕНСЕНА КРЫС	59
<i>С.В. Корепанов, Т.Г. Опенко, Н.Д. Веряскина</i> СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ДИКОРАСТУЩИМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ ВО ВРЕМЯ РАДИАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ	65

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>С.С. Шушанов</i> РОЛЬ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1-ГО ТИПА (IGF-1) И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ЧЛЕНОВ СИСТЕМЫ IGF/ИНСУЛИН В ПРОГРЕССИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ	71
<i>П.А. Черненко, С.Б. Петерсон, Л.Н. Любченко</i> НАСЛЕДСТВЕННАЯ МЕЛАНОМА КОЖИ: КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА	81
Правила оформления статей	3; 17; 47
Список сокращений	91

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-006.81:612.181

*А.А. Вартамян, И.Н. Григорьева, В.С. Домбровский, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников***БЛОКИРОВАНИЕ NOTCH СИГНАЛЬНОГО ПУТИ
СТАБИЛИЗИРУЕТ ВАСКУЛОГЕННУЮ МИМИКРИЮ ПРИ МЕЛАНОМЕ***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация***Вартамян Амалия Арташевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ ЭДнТО***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш. 24; **тел.** +7(499)342-10-65**e-mail:** zhivotov57@mail.ru

Статья поступила 28.02.2012; принята к печати 31.08.2012.

Резюме

Активация Notch сигнального пути необходима для запуска ангиогенеза опухоли. Исследования последних лет указывают на то, что Notch сигнальный путь способствует также прогрессии первичных меланом в более агрессивный фенотип. Целью данной работы явилось исследование вовлечения Notch сигнального пути в становление ВМ при меланоме. На начальном этапе работы мы показывали, что белки Notch сигнального каскада активно экспрессируются в клетках меланомы, выведенных в клеточные линии из опухолевого материала больных диссеминированной меланомой. Блокирование Notch сигнального пути ингибиторами γ -секретазы DAPT, BZ или нейтрализующими антителами к лиганду Jagged 1 стабилизировало СПС на Матригеле. Полученные *in vitro* данные были подтверждены в экспериментальной модели меланомы в бестимусных мышах. По сравнению с контролем ВМ каналы в опухолях, леченых DAPT, были более разветвленными и шире диаметром. Наблюдалась также высокая экспрессия MMP-2 и VEGFR1 – медиаторов ВМ. Более того, зоны некроза в областях опухоли, где присутствовали ВМ-каналы, не обнаружены. Приведенные данные указывают на то, что ВМ может представить новый терапевтический подход к лечению меланомы.

Ключевые слова: васкулогенная мимикрия, меланома, Notch сигнальный путь.*A.A. Vartanian, I.N. Grigorieva, V.S. Dombrovsky, E.V. Stepanova, A.Yu. Baryshnikov***DISRUPTION OF NOTCH SIGNALLING
STABILIZES MELANOMA VASCULOGENIC MIMICRY***FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

Notch signaling plays an important role in tumor angiogenesis. Recent studies suggest that Notch signaling also regulates the progression of primary melanomas towards an aggressive phenotype. The aim of this study was to investigate the involvement of Notch signaling pathway in organization of tumor cells into capillary-like structures (CLS), the phenomenon also known as VM. Here, we show that Notch signaling cascade was constitutively active in melanoma cell lines we used. Blocking Notch signaling with the γ -secretase inhibitors, DAPT, dibenzazepine or Jagged1 neutralizing antibody resulted in stabilization of CLS indicating that Notch signaling pathway attenuates melanoma VM. We further studied this phenomenon on melanomas grafted in nude mice. Compared to control, VM channels in DAPT-treated grafted melanoma became larger and more branched. DAPT-treated melanomas also exhibited an up-regulation of MMP-2 and VEGFR1, both known as VM mediators. Moreover, we did not observe necrosis in VM channels areas of DAPT-treated melanomas. These findings indicate that VM regulated by Notch signaling may present a novel target in melanoma therapy.

Key words: vasculogenic mimicry, notch signaling, melanoma.**Введение**

Антиангиогенная терапия опухоли базируется на ингибировании роста микрососудов [5; 12]. В предклинических исследованиях *in vitro* и *in vivo* выявлены более сотни различных ингибиторов ангиогенеза, и их количество продолжает расти. Но только несколько препаратов – ингибиторов VEGF рецептор-лигандной системы (Авастин, Сунитиниб и др.) одобрены для клинического применения при колоректальном раке, светлоклеточном раке почки, гепатоцеллюлярной карциноме, раке молочной железы [23]. Однако, как показали клинические ис-

следования, к антиангиогенной терапии возникает резистентность. Более того, большинство опухолей практически не отвечают на эту терапию [7; 25]. И хотя этому есть ряд разумных объяснений, гетерогенность васкулярных сосудов может быть одной из причин выживаемости опухолевых клеток: в васкуляризации опухоли традиционный ангиогенез идет параллельно с формированием васкулярных каналов из опухолевых клеток [4]. Эти высокоструктурированные васкулярные каналы формируются метастатическими опухолевыми клетками и ограничены базальной мембраной. Образование микроваскулярной сети агрессивными опухолевы-

ми клетками получило название «васкулогенная мимикрия», тем самым подчеркивается образование таких каналов *de novo*, без участия ЭК, т.е. независимо от ангиогенеза. Функциональное значение ВМ, несмотря на возрастающий интерес к этой проблеме, остается невыясненным. Вероятно, образование такого рода каналов внутри опухоли может частично нейтрализовать отсутствие питания и предотвратить ранний некроз. Высокая статистическая корреляция между способностью опухоли к ВМ и частотой метастазирования опухоли подтверждает эту гипотезу [22].

Notch сигнальный путь – высоко консервативный внутриклеточный сигнальный путь, который активируется при взаимодействии трансмембранного лиганда семейства Jagged (Jagged 1 и 2) и семейства Delta (Delta-like 1; 3 и 4) с Notch рецепторами (Notch1-4) [24]. После связывания рецептор-лиганд Notch рецептор активируется протеолитическим расщеплением внутриклеточного домена, который мигрирует в ядро и, образуя комплекс с ДНК, выполняет функцию транскрипционного фактора и участвует в экспрессии генов Hes1 и Hes5, а также Hey1 и Hey2 [3]. Накоплен достаточно большой клинический материал, указывающий на то, что дерегуляция Notch сигнального пути вовлекается в становление глиомы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака и различных гематопозитических новообразований [1; 9; 16; 26].

Роль Notch сигнального пути при меланоме практически не изучена. Исследования последних лет указывают лишь на то, что экспрессия Notch-1 и Notch-2 рецепторов, а также Notch лиганда активирована в диспластических невусах (*dysplastic nevi*) и меланоме по сравнению с родимыми пятнами (*melanocytic nevi*), т.е. активация Notch сигнального пути служит триггером для прогрессии меланомы в более агрессивный фенотип [18]. С другой стороны, экспрессия Notch рецепторов и их лигандов наблюдается также и на ЭК [13]. Ингибирование этого сигнального пути в эндотелии способствует непродуктивному ангиогенезу, снижая, тем самым, рост опухоли [2].

Два независимых наблюдения привели нас к изучению роли Notch сигнального пути в становлении ВМ при меланоме:

1. Активация Notch сигнального пути в меланоме переводит ее в более агрессивный фенотип, а это является необходимым условием для формирования васкулярных каналов из опухолевых клеток.
2. Следствием подобной активаций является антиангиогенный эффект.

Полученные нами результаты указывают на то, что компоненты Notch сигнального пути экспрессируются и активны в клетках меланомы, которые мы использовали, и что блокирование Notch сигнального пути стабилизирует СПС *in vitro* и увеличивает ВМ в ксенографтах мыши. Мы предполагаем, что регуляция ВМ модулированием Notch сигнального пути может представить новый терапевтический подход к лечению меланомы.

Материалы и методы

Материалы

Кит для PAS-окрашивания (Sigma-Aldrich Company, St Louis, USA). Матригель (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Моноклональные анти-Laminin (клон 4C7) антитела (DAKO A/S, Glostrup,

Denmark). Анти-Notch1 моноклональные антитела (NOVUS Biologicals Inc., Littleton, USA). Анти-Notch2, -3, -4 поликлональные антитела, анти-Jagged-1 поликлональные, anti-Dll4 поликлональные и анти-MMP-2 поликлональные антитела (Abcam (Cambridge, UK), анти-Jagged-2 поликлональные и анти-VEGFR1 поликлональные антитела (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA). Анти-Hes1 поликлональные и анти-Hey1 поликлональные антитела (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan). DAPT и BZ (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

Культура клеток

В работе использованы три клеточные линии Mel Kog, Mel P и Mel Cher [19; 20; 27]. Клетки росли в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% ТЭЗ, 2мМ/мл глутамин и 0,1мг/мл гентамицина. В экспериментах использовали клетки 70–75% конfluence.

3D культура

100 μ л матригеля (8,7 mg/ml) быстро наносился на дно 24-луночной планшеты на льду, планшет оставляли при комнатной температуре в течение часа и затем помещали в CO₂ инкубатор на 30 мин. Клетки добавляли в количестве 2×10^5 на лунку в полной среде RPMI-1640 и продолжали инкубировать при 37 °C в течение 14–16 ч.

Ингибирование Notch сигнального пути

Notch сигнальный путь ингибировали DAPT (1–25 μ M) или BZ (0,1–2,0 μ M). Клетки инкубировали в полной среде RPMI-1640 с различными концентрациями указанных ингибиторов в течение 10–24 ч. Контрольные клетки получали 0,1% ДМСО. Для ингибирования этого сигнального пути нами были также использованы анти-Jagged-1 (5 μ g/ml) нейтрализующие антитела.

Иммуногистохимия

Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей по стандартной методике [8].

Гистохимия

Гистохимическое окрашивание невазкулярных структур проводили как описано в [8].

Вестерн блот анализ

PAGE-SDS электрофорез с последующим переносом белков на мембрану и их окрашиванием проводили как описано в [8].

Импантация опухоли

Клетки метастатической меланомы кожи Mel Cher перевивались иммунодефицитным мышам 6–8 недель подкожно в количестве 5 млн. клеток на мышь. Иммунодефицитные мыши были разделены на 3 группы по 6 особей в каждой. DAPT в дозе 3 или 20 мг/кг веса вносили внутрибрюшинно один раз в день в течение 19 дней, начиная со второго дня после имплантации опухоли. Контрольные мыши получали ФСБ с 10% ДМСО по той же схеме. Динамика роста перевиваемых опухолей оценивалась каждые 3 дня, начиная с 7 дня после перевивки. Размеры опухоли определяли как отношение ширины к длине и умножали на половину ширины. На 21 день мышей забивали, удаляли опухоль, фиксировали 4%-ным параформальдегидом (pH 7,2) и заключали в парафин. Слайды разрезались шириной 5 мкм. Плотность сосудов определяли окрашиванием срезов на CD31. Для визуализации невазкулярных каналов использовали PAS-окрашивание.

Плотность PAS-положительных структур определялась по интенсивности красной краски по программе «NIS Elements» (version 2.32, Nikon Instruments, Melville, N.Y., USA). Слайды окрашивались также антителами к ламинину, обязательному компоненту базальной мембраны васкулярных каналов, сформированных опухолевыми клетками.

Статистический анализ

Student's *t*-test был использован для статистической обработки результатов. Значения $P < 0,05$ считали статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

Иммуноцитохимическое исследование экспрессии молекул Notch

сигнального пути в клетках меланомы

Иммуноцитохимический анализ панели клеточных линий Mel Cher, Mel Kog и Mel P был использован для оценки экспрессии компонентов Notch каскада. Экспрессия Notch1 и Dll1 не определялась во все трех клеточных линиях. Экспрессия Jagged2 и Dll4 была слабо выраженной. Однако мы заметили высокую интенсивность для Notch3, Notch4 и Jagged1 в Mel Cher и Mel Kog клетках. Notch3 активно экспрессировалась в цитоплазме и ядрах клеток, однако Notch4 и Jagged1 обнаруживались только в цитоплазме. В цитоплазме Mel Cher и Mel Kog клеток экспрессия Notch2 была средней интенсивности. Экспрессия Notch2 и Notch4 была несколько снижена в Mel P клетках по сравнению с Mel Cher клетками. Поскольку все эти три клеточные линии формировали СПС на Матригеле [8], мы предполагаем, что экспрессии Notch2 и Notch4 не столь необходимы для вовлечения клеток в ВМ. Результаты иммуноцитохимических исследований представлены в таблице.

Влияние ингибирования Notch сигнального пути на формирование СПС

За последние пять лет накоплен достаточно большой объем экспериментальных данных, указывающих на то, что активный Notch сигнальный путь останавливает пролиферацию ЭК, способствуя их дифференцировке [14]. Основываясь на этих данных, мы предположили, что ингибирование Notch сигнального пути, который будет ингибировать также и ангиогенез, может вовлекаться в организацию опухолевых клеток в СПС. Активация Notch сигнального пути напрямую зависит от функционального состояния γ -секретазы, фермента, который разрезает внутриклеточный домен Notch рецептора, способствуя его транслокации в ядро. Экспрессия Hes-1, транскрипционного фактора, находящегося под контролем Notch сигнального пути, значительно снижалась, когда клетки инкубировали с ингибитором γ -секретазы, DAPT (рис. 1, A1). Эти результаты были подтверждены использованием другого ингибитора Notch сигнального пути. Как и ожидалось, BZ снижал экспрессию Hes1 (рис 1, A1). Исследовали экспрессию и другого транскрипционного фактора, тоже находящегося под контролем Notch сигнального пути, Hey1. Уровень Hey1 был изначально выше по сравнению с Hes1, и его экспрессия практически не менялась в ответ на DAPT (рис.1, A3), что указывало на то, что Hey1 скорее является маркером агрессивности опухоли и в ВМ не вовлекается. Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что Notch сигнальный путь активирован в метастатических клетках меланомы.

Далее мы исследовали влияние ингибирования Notch сигнального пути на формирование СПС. Надо отметить, что эти структуры стабильны в течение 20–24 ч после посева клеток на матрикс, затем клетки становятся круглыми, теряя связь клетка – клетка и клетка – внеклеточный матрикс, и BZ СПС разрушаются. Низкие концентрации DAPT (ниже 2 μ M) не оказывали никакого влияния на структуру СПС. Когда же клетки росли на Матригеле в присутствии 20 μ M DAPT, спонтанное разрушение клеточных контактов происходило в течение 32–36 ч (рис 1, B-C, F-G), указывая на то, что Notch сигнальный путь регулирует целостность СПС. Для подтверждения этого феномена Mel Cher клетки сажали на Матригель в присутствии другого ингибитора γ -секретазы, BZ. СПС также были стабильны в течение 32–36 ч (рис. 1, D, H).

Эти результаты были верифицированы блокированием связывания лиганд-рецептор. Анти-Jagged1 нейтрализующие антитела также стабилизируют СПС (Рис. 1, E). Этот эффект воспроизводился и на двух других клеточных линиях. Так, селективный разрыв Notch сигнального пути ведет к стабилизации СПС.

DAPT изменяет васкуляризацию опухоли

В развитии меланомы различают две фазы: горизонтальную и вертикальную фазу роста, когда клетки меланомы приобретают способность проникать через дермальный слой и базальную мембрану в окружающую соединительную ткань и кровеносные сосуды [15]. Вертикальная фаза роста характеризуется быстрым ростом опухоли и склонна к метастазированию. Каналы ВМ в опухоли появляются при переходе ее в вертикальную фазу роста [10]. Нам ранее была разработана методика роста человеческой меланомы на бестимусных мышах и для подтверждения полученных нами *in vitro* данных мы исследовали влияние DAPT на рост опухоли и ее васкуляризацию в экспериментальной модели меланомы. DAPT вводили внутривентриально в дозе 3 и 20 мг/кг. Анализ ксенографтов показал, что плотность сосудов (MVD) в леченых 20 мг/кг DAPT ксенографтах снижена по сравнению с контролем ($6,37 \pm 1,84$ против $9,60 \pm 2,9$ (SE) микрососудов), что хорошо согласуется с литературными данными о способности DAPT снижать кровоснабжение опухоли [17; 29]. Доза 3 мг/кг DAPT не влияла на васкуляризацию опухоли. Окрашивание срезов на присутствие ламинина, белка внеклеточного матрикса, который является необходимым компонентом тубулярных структур[2], показало, что васкулярные каналы, сформированные опухолевыми клетками стали шире в диаметре и более разветвленными (рис. 2, A, D). Окрашивание срезов реагентом PAS подтвердило эти наблюдения (рис. 2, C, E). Особо следует отметить, что плотность кровеносных сосудов была значительно ниже в PAS-положительных зонах опухоли ($P=0,039$), что подтверждало ранее высказанную гипотезу о роли ВМ как компенсаторного механизма кровоснабжения опухоли. Гистологический анализ опухоли показал большие зоны некроза в DAPT-леченых ксенографтах (рис. 2, B). И совершенно неожиданным оказался тот факт, что в тех областях опухоли, где наблюдалась высокая плотность ВМ-каналов, отсутствовал некроз.

Недавно было высказано предположение, что антиангиогенная терапия опухоли переводит опухоль в более агрессивную фазу роста, которая характеризуется увеличением инвазии и метастазирования [21].

Таблица

Экспрессия компонентов Notch сигнального каскада в клетках меланомы

Клеточная линия	Notch сигнальные молекулы							
Mel Cher	Notch1	Notch2	Notch3	Notch4	Jagged1	Jagged2	Dll1	Dll4
	-	++	+++	+++	+++	+	-	+
Mel Kor	-	++	+++	+++	+++	+	-	+
Mel P	-	+	+++	++	+++	+	-	-

Интенсивность Notch сигнальных молекул оценивали как +++, ++ или + по мере снижения интенсивности окраски.

В результате антиангиогенной терапии высоко агрессивные опухолевые клетки приобретают эндотелий-подобные характеристики ВМ и уже ВМ позволяет опухоли выжить, предоставляя питание и кислород в области опухоли с выраженной гипоксией. Наши данные являются первым экспериментальным подтверждением гипотезы, что в условиях подавления ангиогенеза, опухоль прибегает к альтернативной васкуляризации, независимой от эндотелия. Для выяснения возможных механизмов активации ВМ в ксенографтах в ответ на DAPT мы окрашивали срезы на MMP-2 и VEGFR1, белки, идентифицированные ранее как медиаторы ВМ. Было показано недавно, что MMP-2 участвует в расщепление 5γ2-цепи ламинина во фрагмент, необходимый для формирования ВМ-каналов [11]. Рис. 3, А, С демонстрирует, что уровень MMP-2 значительно выше в ксенографтах, леченых DAPT, чем в контроле. Мы также исследовали влияние блокирования Notch сигнального пути на экспрессию VEGFR1, недавно идентифицированный нами и другими как мессенджер ВМ [6; 28]. Уровень мембранного VEGFR1 в DAPT-леченых опухолях был также значительно выше, чем в контроле (рис. 3, В, D). Рост опухоли после 21 дня лечения 20 мг/кг DAPT снижался незначительно (см. рис. 2, F) по сравнению с контролем ($0,508 \pm 0,18$ g (SE), $P=0,02$ против $0,315 \pm 0,052$ g ($P=0,01$)). Эти результаты согласуются с литературными данными о влиянии DAPT на рост опухоли [17; 29].

Литература

1. Aster J.C., Blacklow S.C., Pear W.S. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies // J Pathol. – 2011. – 223(2). – P. 262–73.
2. Cristofaro B., Emanueli C. Possible novel targets for therapeutic angiogenesis // Curr Opin Pharmacol. – 2009. – 9(2). – P. 102–8.
3. Eiken H.M., Adams R.M. Dynamics of endothelial cell behaviour in sprouting angiogenesis // Curr Opin cell Biol. – 2010. – 22(5). – P. 617–25.
4. Fan Y.Z., Sun W. Molecular regulation of vasculogenic mimicry in tumours and potential tumor-target therapy // World J Gastrointest Surg. – 2010. – 2(4). – P. 117–24.
5. Feige J.J. Tumour angiogenesis: recent progress and remaining challenges // Bull Cancer. – 2010. – 97(11). – P. 1305–10.
6. Frank N.Y., Schatton T., Kim S. et al. VEGFR1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth // Cancer Res. – 2011. – 71(4). – P. 1474–85.
7. Gerger A., LaBonte M., Lenz H.L. Molecular predictors of response to antiangiogenesis therapies // Cancer J. – 2011. – 17(2). – P. 134–41.
8. Gridley T. Notch signalling in the vasculature // Curr Top Dev Biol. – 2010. – 92. – P. 277–309.
9. Guo S., Liu M., Gouzalez-Perez R.R. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer // Biochem Biophys Acta. – 2011. – 1815(2). – P. 197–213.
10. Helfrich E., Schadendorf D. Blood vessel maturation, vascular phenotype and angiogenic potential in malignant melanoma: One step forward for overcoming anti-angiogenic resistance? // Mol Oncol. – 2011. – 5. – P. 137–49.
11. Hess A.R., Seftor E.A., Seftor R.E. et al. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry // Cancer Res. – 2003. – 63. – P. 4757–62.
12. Hiratsuka S. Vasculogenesis, angiogenesis and special features of tumour blood vessels // Front Biosci. – 2011. – 16. – P. 803–14.

Заключение

Полученные нами данные указывают на то, что Notch сигнальный путь активен в клетках метастатической меланомы, которые мы использовали, и ингибирование Notch сигнального пути стабилизирует СПС *in vitro* и увеличивает ВМ в экспериментальной модели опухоли на бестимусных мышах.

Мы также показали, что активация процесса формирования ВМ-каналов является следствием апрегуляции VEGFR1 и MMP-2, белков известных как триггеры ВМ.

Более того мы не обнаружили зоны некроза в PAS-положительных областях опухоли, что свидетельствует о том, ВМ-каналы являются функционально активными и поддерживают рост опухоли.

Таким образом, суммируя полученные нами *in vitro* и *in vivo* данные, мы предполагаем, что ингибирование Notch сигнального пути, который является по сути антиангиогенным воздействием, запускает васкуляризацию опухоли, независимую от эндотелиума, ВМ.

Полученный нами впервые экспериментальный материал позволяет предложить в качестве нового терапевтического подхода к лечению меланомы комбинирование антиангиогенной терапии с анти-ВМ препаратами.

13. *Jabobsson L., Bentley K., Gerhardt U.* VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning // *Biochem Soc Trans.* – 2009. – 37(pt6). – P. 216–33.
14. *Kame T.* Novel insights into the differentiatial funcrions of Notch ligands in vascular formation // *J Angiogenesis Res.* – 2009. – 16. – P. 1–8.
15. *Ko J.M., Verez N.F., Tsao H.* Pathways to melanoma // *Semin Cutan Med Surg.* – 2010. – 29(4). – P. 210–7.
16. *Koch U., Radtke F.* Notch signaling in solid tumor // *Curr Top Dev Biol.* – 2010. – 92. – P. 367–409.
17. *Luistro L., He W., Smith M. et al.* Preclinical profile of a potent γ -secretase inhibitor targeting Notch signaling with in vivo efficacy and pharmacodynamic properties // *Cancer Res.* – 2009. – 68(19). – P. 7672–80.
18. *Massi D., Tarantini F., Franchi A. et al.* Evidence for differential expression of Notch receptors and their ligands in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma // *Modern Pathol.* – 2006. – 19. – P. 246–54.
19. *Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Baryshnikov A.Yu. et al.* Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation // *Vest Ross Akad Med Nauk.* – 2005. – 7. – P. 37–40.
20. *Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Morozova L.F., et al.* Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // *Mel Res.* – 2008. – 18(5). – P. 303–13.
21. *Paetz-Ribes M., Allen E., Hudock J. et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis // *Cancer Cell.* – 2009. – 15. – P. 220–31.
22. *Paulis Y.W., Soetekouw P.M., Verheul H.M.* Signaling pathways in vasculogenic mimicry // *Biochem Biophys Acta.* – 2010. – 1806(1). – P. 18–28.
23. *Quesada A.R., Medina M.A., Munoz-Chapuli R. et al.* Do not say ever never more: the ins and outs of antiangiogenic therapies // *Curr Pharm Des.* – 2010. – 16(35). – P. 3932–57.
24. *Schwanbeck R., Martini S., Bernoth K. et al.* The Notch signalling pathway: Molecular basis of cell content dependency // *Eur J Cell Biol.* – 2011. – 90(6–7). – P. 572–81.
25. *Sharma P.S., Sharma R., Tyagi T.* VEGF/VEGFR pathway inhibitors as anti-angiogenic agents: Present and Future. – 2011. – 11(5). – P. 624–33.
26. *Sjolund J., Johanson M., Manna S. et al.* Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signalling *in vitro* and *in vivo* // *J Clin Invest.* – 2008. – 118(1). – P. 217–28.
27. *Vartanian A., Burova O., Stepanova E. et al.,* The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // *Mel Res.* – 2007. – 17. – P. 1–8.
28. *Vartanian A., Stepanova E., Grigorieva I. et al.* VEGFR1 and PKCalpha signalling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner // *Mel Res.* – 2011. – 21(2). – P. 91–8.
29. *Yan M., Plowman G.B.* Delta-like 4/Notch signalling and its therapeutic implications // *Cancer Res.* – 2007. – 13(24). – P. 7243–6.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В начале статьи должно быть приведено **Резюме**. В нем должны быть кратко без 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.

УДК 616.24-006.6:577.115

*А.Н. Шнейдерман¹, А.И. Тарасова¹, М.С. Вагида¹, Е.Ю. Брагин², И.Б. Зборовская¹***ВЛИЯНИЕ НОКДАУНА ФЛОТИЛЛИНА-2
НА СВОЙСТВА КЛЕТОК ЛИНИИ H460 РАКА ЛЕГКОГО**¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва²Инновационно-технологический центр «Биологически активные соединения и их применение» РАН**Контактная информация:***Шнейдерман Анастасия Николаевна, аспирант 3 года обучения лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ Канцерогенеза***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр.15; **тел.:** +7(499)324-17-64**e-mail:** shneyderman.an@gmail.com

Статья поступила: 12.03.2012, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

Данная работа посвящена изучению влияния экспрессии рафт-образующего белка флотиллин-2 на свойства клеток рака легкого, ассоциированные с опухолевой прогрессией. В современной литературе существуют экспериментальные данные о влиянии флотиллина-2 на метастатические свойства клеток меланомы. Однако механизмы действия флотиллина-2 на эпителиальные опухолевые клетки, а также его роль в регуляции процессов метастазирования и стимуляции опухолевой прогрессии при раке легкого остаются неизученными. На экспериментальной модели клеток немелкоклеточного рака легкого (линия H460) впервые показано влияние изменения экспрессии флотиллина-2 на пролиферацию и миграцию клеток. Также полученные данные свидетельствуют о существовании механизмов взаимного регулирования уровня различных рафт-образующих белков.

Ключевые слова: липидные рафты, флотиллины, рак легкого.*A.N. Shneyderman¹, A.I. Tarasova¹, M.S. Vagida¹, E.Y. Bragin², I.B. Zborovskaya¹***THE INFLUENCE OF FLOTILLIN-2 KNOCKDOWN
ON THE CHARACTERISTICS OF H460 LUNG CANCER CELL LINE**¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow²Center of Innovations and Technologies «Biologically Active Compounds and their Applications» of RAS, Moscow**Abstract**

This article is focused on the influence of Flotillin-2 expression on tumor progression associated characteristics of lung cancer cells. Today the involvement of Flotillin-2 in metastasis of melanoma is well known. However the exact mechanisms of Flotillin-2 influence on another tumor cells as well as its role in others malignancies remains unstudied. In present study we for the first time showed the influence of Flotillin-2 expression on proliferation and migration of cells on the experimental model system of H460 lung cancer cell line. Our findings also suggest the existence of reciprocal regulation of different lipid rafts proteins expression.

Key words: lipid rafts, flotillin, lung cancer.**Введение**

Рак легкого (РЛ) является одним из самых распространенных, неблагоприятно текущих и сложно поддающихся лечению онкологических заболеваний [1]. На сегодняшний день важнейшими факторами прогноза для больных РЛ являются клинические показатели: степень дифференцировки опухолевых клеток и наличие метастазов в регионарные лимфоузлы и отдаленные органы. Поиск дополнительных прогностических факторов, и в первую очередь, молекулярных маркеров, представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной молекулярной онкологии.

В последние годы все больший интерес вызывает изучение липидных рафтов – микродоменов в составе клеточных мембран, богатых холестерином и сфинголипидами, а также включающих различные сигнальные молекулы. Липидные рафты – высоко динамичные и короткоживущие структуры, которые могут стабилизироваться за счет особых рафт-образующих белков [10]. Стабилизированные липидные рафты способны выполнять роль сигнальных «платформ» и регулировать пути передачи

сигналов, концентрируя молекулы различных каскадов и обеспечивая их взаимное влияние друг на друга. Множество сигнальных путей, в частности, от рецепторов ростовых факторов, белков межклеточных и фокальных контактов, G-белков, регулируется липидными рафтами [13].

В настоящее время известно большое количество рафт-образующих белков.

К ним относятся белки семейств кавеолинов, тетраспанинов, ретикулонов и группа SPFH белков (от Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C), в которую входят stomatin, stomatin-подобные белки, прохититины, флотиллины, подоцин и эрлины [4].

Наиболее изученными среди них являются белки семейства кавеолинов, которые образуют особый тип липидных рафтов, способных формировать кавеолы. Последние участвуют в ряде важнейших процессов в клетке, таких как везикулярный транспорт, поддержание гомеостаза холестерина, регуляция транспорта ионов Ca^{2+} из внеклеточного пространства в цитоплазму, а также влияют на передачу различных сигналов внутрь клетки за счет регуляции активности участников сигнальных путей [14].

К семейству флотиллинов относятся два белка – флотиллин-1 и -2, обладающие высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей. Флотиллины, как и кавеолы, экспрессируются практически во всех типах тканей взрослого организма. Однако они также обнаруживаются в нейронах и лимфоцитах, где кавеолы отсутствуют [2]. Флотиллины участвуют в везикулярном транспорте, реорганизации актинового цитоскелета, а также могут регулировать передачу сигналов от рецепторов ростовых факторов, G-белков и Т-клеточных рецепторов [8].

Несмотря на возрастающий интерес к рафт-образующим белкам, их роль в нормальной и патологической физиологии человека остается мало изученной. Наибольшее количество исследований посвящено изучению белка кавеолин-1, который играет двоякую роль в процессе опухолевой трансформации клеток, и, в зависимости от гистогенеза опухоли и стадии опухолевой прогрессии, может выступать как в качестве опухолевого супрессора, так и онкогена [18]. Что касается флотиллинов, то существуют лишь скудные и разрозненные данные об их участии в процессах канцерогенеза. Известно, что экспрессия флотиллина-2 является независимым фактором неблагоприятного прогноза при меланоме [9]. Однако механизмы действия флотиллина-2 на опухолевые клетки, а также его роль при возникновении злокачественных новообразований различного происхождения на сегодняшний день остаются неизученными.

Целью данной работы было исследование влияния экспрессии флотиллина-2 на характеристики клеток рака легкого, ассоциированные с опухолевой прогрессией. Мы показали, что в линии крупноклеточного РЛ H460 подавление экспрессии флотиллина-2 с помощью малых шпилечных РНК (мшРНК) приводит к снижению скорости пролиферации клеток, ухудшению миграции и снижению активности протеазы MMP-2, что может свидетельствовать о важной роли данного белка в регуляции этих ключевых для метастазирования процессов.

Материалы и методы

Клеточные линии. В качестве экспериментальной модели для исследования использовалась клеточная линия крупноклеточного РЛ человека H460, а для получения лентивирусных частиц – линия эпителиальных клеток 293FT.

Обе линии культивировались при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Для культивирования использовалась среда RPMI (ПанЭко, Россия) с L-глутамином (0,294 мг/мл) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (РАА Laboratories, Австрия), 0,1 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина.

Получение экспрессирующих векторов. В данной работе использовались следующие последовательности мшРНК:

sh1-Flot-2

5'CCGGCGGTATGACAAAGTGGACTCTCGAGTAGTCCACTTTGTCATACACGTTTTTG3',
sh2-Flot-2

5'CCGGGAGACAACAGTAAGGTCACATCTCGAGATGTGACCTTACTGTGTCTCTTTT3' (смысловая и антисмысловая последовательность подчеркнуты).

Предшественники мшРНК к кодирующей последовательности мРНК *FLOT-2* клонировались в лентивирусный вектор pLKO.1-puro по сайтам AgeI и EcoRI. Для клонирования каждого конструктора синтезировались пары олигонуклеотидов F и

R, модифицированные липкими концами с соответствующими рестриктивными сайтами. Олигонуклеотиды отжигали друг на друге в эквимольном соотношении при +95 °С в течение 10 мин. 20 пмоль полученной смеси использовали для киназной реакции с помощью киназы T4 (Fermentas, США), согласно протоколу производителя. Лигирование фрагментов в лентивирусный вектор проводили с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 (Fermentas, США) в условиях, рекомендованных производителем (1-2 ед фермента на 20 мкл лигазной смеси, при +16 °С в течение часа).

Затем ДНК-лигазу инaktivировали инкубацией в течение 10 мин при +65 °С, и полученную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*. Секвенирование полученного конструктора ДНК проводилось с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, США). Для секвенирования использовали праймер pLKO.1-puro seq. – 5'GACTATCATATGCTTACCGT3'.

Трансфекция и инфекция. Для получения псевдолентивирусных частиц использовали клеточную линию 293FT. Для трансфекции брали суммарно 2 мкг плазмидной ДНК лентивирусного вектора pLKO.1-puro (Addgene, США), несущего последовательность мшРНК, pVSV-G (Clontech, США) и пакующей плазмиды pDeltaR8.2 (Addgene, США), кодирующей вирусные белки. Все три плазмиды смешивались в эквимольном соотношении. Трансфекцию проводили с использованием реагента LipofectAMINE 2000™ Reagent (Invitrogen, США), согласно протоколу производителя. Содержащиеся в супернатанте вирусные частицы собирали через 24; 48 и 72 ч, центрифугировали 10 мин при 1500 g для удаления клеточного дебриса и использовали для инфекции.

За день до инфекции псевдовидирусными частицами клетки линии H460 рассеивались на 6-луночные планшеты в 2 мл среды так, чтобы к моменту инфекции культура достигала 20–30% конфлюентности. В день инфекции среду заменяли на свежую, содержащую 50% вирусного супернатанта и 8 мкг/мл полибрена (Sigma-Aldrich, США). Использовались 24-, 48- и 72-часовые инокуляты вируса. После окончания инфекции клетки рассаживали в 60-мм культуральные чашки для селекции на антибиотике. Для контроля селекции рассевали неинфицированные клетки. Селекция проводилась на среде с пуромицином (3 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США) в течение 3–4 дней. После окончания селекции клетки культивировали до достижения состояния субконфлюентности, замораживали и хранили при –70 °С в эмбриональной сыворотке, содержащей 10% ДМСО. Для дальнейших экспериментов использовали свежеразмороженные аликваты полученных клеточных линий.

Выделение РНК и получение кДНК методом обратной транскрипции. Выделение РНК из клеточных культур производили с использованием реактива Trizol (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Для получения одноцепочечных кДНК к 2 мкг тотальной РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (Fermentas, США), согласно протоколу производителя (1 ед фермента на 1 мкг РНК), добавляли 80 пмоль random9 праймеров и инкубировали 5 мин при +70 °С. Затем на льду в смесь вносили 25 мкл реагента «RT-MIX» (RT-Buf 10-кратный (Fermentas, США), 40 мМ дНТФ, 10 ед RNAsin (Promega, США)) и инкубиро-

вали еще 5 мин при +37 °C. После этого вносили 200 ед обратной транскриптазы M-MuLV (Fermentas, США) и проводили реакцию при +42 °C в течение 1 часа. Реакцию останавливали прогреванием смеси при +70 °C в течение 10 мин. Объем пробы доводили до 200 мкл деионизированной водой и хранили при –20 °C.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили с использованием амплификатора iCycler iQ5 (BioRad Laboratories GmbH, Германия). Матрицей для ПЦР служила кДНК. Реакционная смесь включала: 10 пмоль 5' и 3' праймеров, 1,6 mM MgCl₂, 0,25 мкМ дНТФ, амплификационный буфер 10x с интеркалирующим флуоресцентным красителем Eva Green (Синтол, Россия), 1 ед Taq-ДНК полимеразы (Синтол, Россия). Реакционная смесь проходила предварительное прогревание в течение 10 мин при +95 °C и последующие 40 циклов денатурации (+95 °C), отжига праймеров (+60 °C) и полимеризации (+72 °C) с детекцией количества накопленного продукта по спектру флуоресценции в конце стадии элонгации. Каждую реакцию проводили в шести повторах. В работе использовались следующие праймеры: FLOT-2 REAL F –

5'GCAGCGAGAATTCGACGAG3',

FLOT-2 REAL R –

5'GGTAAGTGGGGCAGCGAT3',

FLOT-1 REAL F –

5'TGAGATTGCCACATTGCC3',

FLOT-1 REAL R –

5'GCTAACCACACTGATGCCCA3',

STOM REAL F – 5'GCAGCCGAAGGAGAAATG3',

STOM REAL R – 5'CTCAGCAGCAATGGTGGTC3',

CAV-1 F – 5'CCGCGACCCCTAACACCTC3',

CAV-1 R – 5'GCCTTCCAAATGCCGTCAA3',

GAPDH F – 5'TTGCCATGGGTGGAATCATA3',

GAPDH R – 5'TCGGAGTCAACGGATTGGT3'.

Ген GAPDH, являющийся геном домашнего хозяйства, использовали в качестве референсного гена для выравнивания внесенного в реакцию количества транскриптов. Обработка результатов эксперимента и расчет относительной экспрессии проводились с помощью программ Bio-Rad iQ5 2.0 Standard Edition Optical System Software и REST 2005. Расчет коэффициента эффективности реакции проводился с использованием программы LinRegPCR.

Приготовление клеточных лизатов и Вестерн-блот гибридизация. Клеточные лизаты получали из субконфлюентного моно слоя клеток. Клетки промывали 2 раза фосфатно-солевым буфером (PBS), затем лизировали в 100–200 мкл буфера для приготовления лизатов (RIPA) (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM ЭДТА, 1% Triton X-100, 10% глицерин, 0,1% SDS, 0,5% деоксихолат натрия, 0,05 mM NaVO₄, 10 mM NaF, protease inhibitor cocktail (Roche, Швейцария), 1 mM DTT). Лизис проводили в течение 30 мин при температуре +4 °C при постоянном перемешивании, затем лизаты центрифугировали 10 мин при 15000 g. Супернатант хранили в аликвотах при –70 °C.

Определение уровня белков проводили методом Вестерн-блот гибридизации по стандартному протоколу. Для идентификации белков использовались следующие антитела: anti-Flotillin-2 BD 610384 (BD Transduction Laboratories, США), anti-Flotillin-1 BD 610821 (BD Transduction Laboratories, США), anti-Caveolin-1 C3237 (Sigma-Aldrich, США), anti-Stomatin sc-134554 (Santa Cruz, США), anti-p21 sc-817 (Santa Cruz, США), anti-p53 sc-126 (Santa Cruz,

США), anti-actin ab8227 (Abcam, Англия), anti-mouse козы анти тела 2367 (Cell Signalling, США), anti-rabbit козы анти тела 29902 (Upstate cell signaling solutions, США). Хемиллюминесцентную реакцию регистрировали на приборе Kodak GelLogic 2200 Imaging System (Carestream Health Inc., США) с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE.

Анализ ферментативной активности протеиназ MMP и uPA. Для анализа активности протеиназ в кондиционированной среде клетки рассаживали в 6-луночные планшеты (500 000 клеток на лунку). На следующий день среду меняли на бесывороточную, еще через сутки кондиционированную среду от клеток собирали и центрифугировали 10 мин при 1500 g. Супернатант хранили в аликвотах при –70 °C. Анализ активности матриксных металлопротеаз и uPA проводили согласно протоколу, описанному в литературе [7].

Выделение ядер клеток и проведение исследования клеточного цикла на проточном цитофлуориметре. Клетки рассаживали в 6-луночные планшеты (20000 клеток на лунку), через сутки клетки снимали раствором Версена, открывали 10 мин при 1500 g и лизировали в лизис-буфере (0,1 % цитрата натрия, 0,3 % Nonidet P40 (AppliChem GmbH, Германия), РНКазы А 100 мкг/мл, пропионид йодид 50 мкг/мл). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS canto II (BD Biosciences, США), результаты анализировали с помощью программ FACSDiva V6.0 и WinMdi.

Клеточные эксперименты. Для анализа скорости пролиферации клетки сажали в 6-луночные планшеты (20 000 клеток на лунку) и культивировали в среде с 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Анализ проводили в пяти временных точках с интервалом в 24 ч, начиная с 24 ч после рассаживания клеток в планшеты. Каждая временная точка дублировалась. Количество клеток в лунках определяли подсчетом в камере Горяева.

При проведении теста на миграцию 20 000 клеток, ресуспендированных в среде без сыворотки, помещали внутрь камеры Бойдена с размером пор 8 мкм (Millipore, США), внешнюю камеру заполняли средой с 10 %-ной эмбриональной бычьей сыворотки. Клетки культивировали в течение 24 часов, после чего оставшиеся клетки удаляли с внутренней поверхности камеры. Клетки, мигрировавшие через отверстия в мембране на внешнюю поверхность, фиксировали в PBS с 3,7% формальдегида, окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 25 мкг/мл и фотографировали с помощью инвертированного светового микроскопа Olympus IX-51 (10x увеличение) (Olympus Corporation, Япония). Способность клеток к миграции по градиенту ростовых факторов оценивали по среднему числу клеток в пяти полях видимости.

Результаты и их обсуждение

На сегодняшний день роль флотиллинов в канцерогенезе изучена мало. Показано, что повышение экспрессии флотиллина-1 в образцах рака молочной железы по сравнению с таковой в нормальной ткани коррелирует с клинико-морфологическими показателями и является независимым фактором неблагоприятного прогноза заболевания [9]. Кроме того, подавление экспрессии флотиллина-1 в клеточных линиях рака молочной железы приводит к уменьшению туморогенности последних *in vivo* и снижению скорости проли-

ферации *in vitro* [9]. Флотиллин-1 оказывает митогенное влияние на клетки аденокарциномы простаты человека, что может быть связано с его способностью взаимодействовать с киназой Auroga B и изменять ее активность [5; 15].

Экспрессия флотиллина-2 изменяется при опухолевой трансформации клеток. Уровень данного белка повышается при меланоме и коррелирует со стадией заболевания [6]. В экспериментах *in vivo* доказано существование связи между уровнем экспрессии флотиллина-2 и метастатической способностью клеток меланомы. Так, суперэкспрессия флотиллина-2 в низкотуморогенных и низкометастазных линиях резко увеличивает их туморогенность и способность к метастатизированию на модельной системе иммунокомпетентных мышей. Кроме того, исследования в культуре клеток *in vitro* показали, что флотиллин-2 увеличивает скорость пролиферации клеток меланомы в присутствии ростовых факторов и усиливает способность клеток к инвазии через Матригель [6]. В данной работе мы исследовали влияние подавления экспрессии флотиллина-2 на свойства клеток РЛ, ассоциированные с опухолевой прогрессией.

Получение производных клеточной линии H460 с подавленной экспрессией гена FLOT-2. В качестве модели мы использовали высокометастазную клеточную линию H460, которая была получена в 1982 г. из плевральной жидкости больного крупноклеточным РЛ [3]. Из литературных данных известно, что данная линия обладает высоким метастатическим потенциалом, и при ортотопическом введении ксенографтам она дает множественные метастазы в регионарные лимфоузлы и в отдаленные органы [19]. Для изучения влияния экспрессии флотиллина-2 на свойства клеток линии H460 его эндogenous экспрессия была подавлена с помощью двух различных последовательностей, кодирующих мшРНК к мРНК *FLOT-2* (флотиллина-2) человека. В качестве контроля использовалась мшРНК к мРНК зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein) GFP, и получена соответствующая линия H460-sh-GFP. Как показано на рис. 1А, в обеих линиях с подавленной экспрессией флотиллина-2 уровень продукции соответствующего белка снижен по сравнению с контрольной линией, причем снижение более выражено для линии H460-sh1-Flot-2. Анализ ПЦР в реальном времени показал, что относительный уровень мРНК флотиллина-2 значительно снижается в обеих линиях с мшРНК, что полностью коррелирует с результатами Вестерн-блот гибридазации (рис. 1Б).

Исследование характеристик полученных клеточных линий. Анализ динамики роста клеток выявил, что при подавлении экспрессии флотиллина-2 происходит уменьшение скорости пролиферации клеток, которое в линии H460-sh1-Flot-2 выражено ярче, чем в H460-sh2-Flot-2 (рис. 2). Замедление пролиферации может быть связано с остановкой клеток в одной из фаз клеточного цикла. Чтобы проверить это предположение, мы провели исследование клеточного цикла в полученных линиях с помощью проточного цитофлуориметра. Хотя мы не обнаружили статистически значимых различий в этом эксперименте, в линиях с подавленной экспрессией флотиллина-2 мы наблюдали слабую тенденцию к увеличению доли клеток в G_0/G_1 фазе клеточного цикла (табл.).

Регуляция клеточного цикла может осуществляться различными путями, однако одним из важнейших модуляторов данного процесса является

белок p53. Этот транскрипционный фактор изменяет экспрессию большого числа генов, но основным медиатором эффектов p53 на клеточный цикл является белок p21^{Cip1/Waf1} – ингибитор циклинзависимых киназ из семейства Cip/Kip. Он непосредственно связывается с комплексами циклинов с циклин-зависимой киназой Cdk2, подавляя их активность и вызывая остановку клеточного цикла в G_0/G_1 фазе. Подавление экспрессии и активности p53 является частым нарушением при злокачественных новообразованиях человека [12]. Однако, из литературы известно, что клетки линии H460 имеют нормальный уровень экспрессии p53 [17].

Мы сравнили уровень p53 и его эффектора p21 в контрольной линии клеток и в линиях с подавленной экспрессией флотиллина-2 с помощью Вестерн-блот гибридазации. В линии H460-sh1-Flot-2 содержание p53 оказалось повышено, однако в линии H460-sh2-Flot-2 оно не отличается от такового контроля (рис. 3). Количество белка p21 увеличено в обеих производных линиях, причем в линии H460-sh1-Flot-2 это увеличение выражено сильнее (рис. 3). Таким образом, на основании полученных данных мы можем предположить, что снижение скорости пролиферации при подавлении экспрессии флотиллина-2 обусловлено повышением уровня белков p53 и p21 и активацией соответствующего сигнального пути. Увеличение уровня p21 при подавлении гена *FLOT-2* вероятно связано не только с возрастанием количества p53, но и с альтернативными путями регуляции, поскольку в линии H460-sh2-Flot-2, где уровень p53 не изменяется, экспрессия p21 усиливается. Активация p53/p21-зависимого пути в данной модельной системе может обуславливать увеличение доли клеток в G_0/G_1 фазе клеточного цикла, хотя оно и незначительно.

Приобретение локомоторного фенотипа опухолевыми клетками играет ключевую роль на поздних стадиях опухолевой прогрессии. Именно он позволяет клеткам покидать первичный очаг опухолевого роста, диссеминировать в отдаленные органы организма и образовывать там метастазы. Мы оценили миграционную способность клеток линии H460 в тесте на миграцию в камерах Бойдена. В данном тесте клетки, помещенные в бессывороточную среду, мигрируют по градиенту концентрации ростовых факторов. Мы обнаружили статистически значимое снижение миграционной способности в обеих линиях клеток с подавленной экспрессией гена *FLOT-2* по сравнению с контрольной линией ($p < 0,05$) (рис. 4).

В процессе инвазии опухолевых клеток в близлежащие ткани важнейшую роль играет изменение их способности расщеплять окружающий внеклеточный матрикс. Данная модификация микроокружения осуществляется за счет продукции и секреции различных внеклеточных протеаз. Мы сравнили активность двух основных систем протеаз в исследуемых клеточных линиях – группы матриксных металлопротеаз (ММП) и урокиназоподобного активатора плазминогена uPA (urokinase plasminogen activator). В контрольной линии клеток H460-sh-GFP мы обнаружили активность только одной матриксной протеазы ММП-2, а также активность uPA и tPA (tissue plasminogen activator) – тканевого активатора плазминогена, который выполняет сходные с uPA функции (рис. 5). Однако в линиях клеток с подавленной экспрессией флотиллина-2 мы наблюдали уменьшение активности ММП-2 и увеличение uPA.

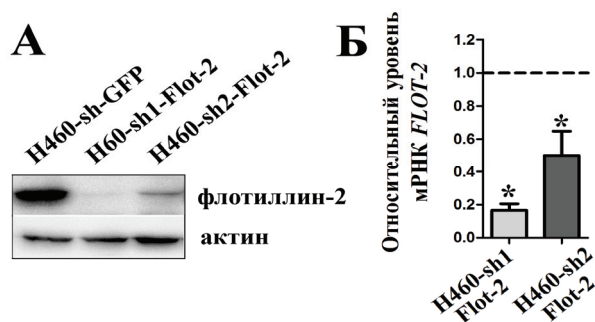


Рис. 1. Подавление экспрессии *FLOT-2* в клетках линии H460:

А: Сравнительный анализ количества белка флотиллин-2 в лизатах клеточных линий H460-sh-GFP, H460-sh1-Flot-2 и H460-sh2-Flot-2 с помощью Вестерн-блот гибридазации. Гибридазация блотов с антителами на бета-актин проводилась в качестве контроля.

Б: Сравнительный анализ уровня мРНК *FLOT-2* с помощью ПЦР в реальном времени. Ген *GAPDH* использовался в качестве референсного. Уровень мРНК нормализовался по контрольной линии H460-sh-GFP (прерывистая линия на обоих графиках) * $p < 0,05$

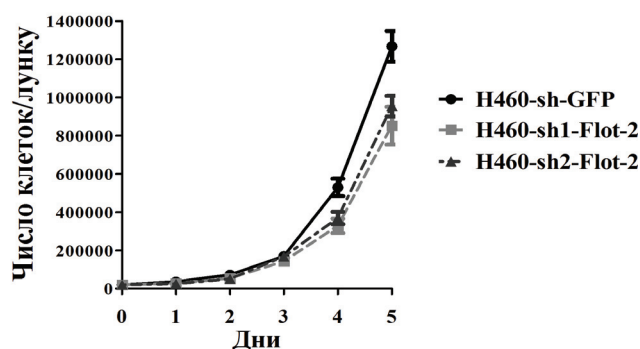


Рис. 2. Анализ динамики роста клеточных линий H460-sh-GFP, H460-sh1-Flot-2 и H460-sh2-Flot-2 прямым счетом в камере Горяева. По 20 000 клеток сажалось в лунки 6-луночного планшета, количество клеток в лунках определялось подсчетом в камере Горяева в пяти временных точках с интервалом в 24 ч.

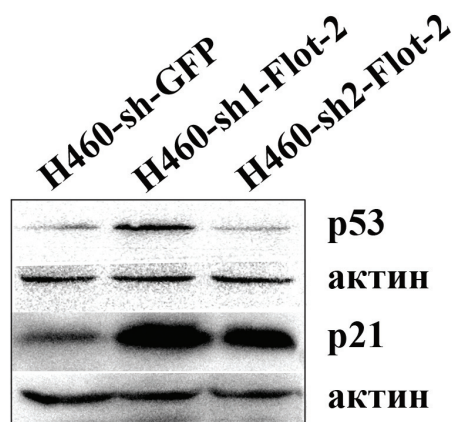


Рис. 3. Сравнительный анализ количества белков p53 и p21 в лизатах клеточных линий H460-sh-GFP, H460-sh1-Flot-2 и H460-sh2-Flot-2 с помощью Вестерн-блот гибридазации. Гибридазация блотов с антителами на бета-актин проводилась в качестве контроля.

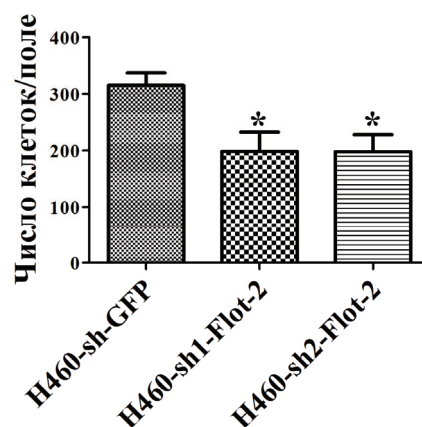


Рис. 4. Тест на миграцию в камерах Бойдена. Для проведения теста 40000 клеток в среде без сыворотки помещались внутрь камеры, внешнюю камеру заполняли средой с 10% сыворотки. Через 24 ч промигрировавшие через отверстия в мембране клетки фиксировались, окрашивались флуоресцентным красителем Hoechst и фотографировались. Способность клеток к миграции оценивалась по среднему числу клеток на поле видимости в пяти полях. * $p < 0,05$

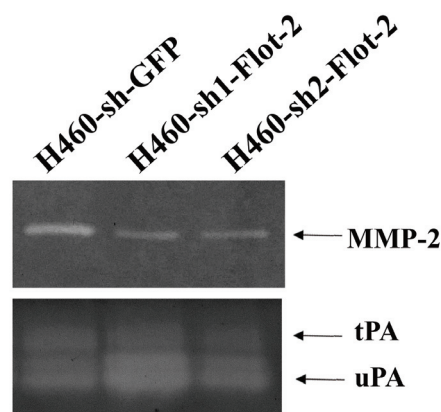


Рис. 5. Анализ ферментативной активности MMP и uPA в клеточных линиях H460-sh-GFP, H460-sh1-Flot-2 и H460-sh2-Flot-2. Исследование проводилось методом зимографии на кондиционированных средах.

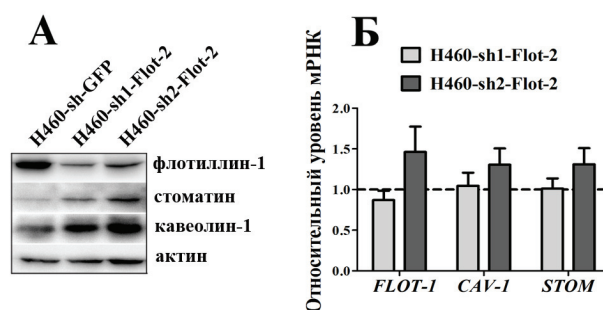


Рис. 6. Подавление экспрессии флотиллина-2 влияет на белковый уровень флотиллина-1, кавеолина-1 и стоматина:

А: Сравнительный анализ количества белков флотиллин-1, кавеолин-1 и стоматин в лизатах клеточных линий H460-sh-GFP, H460-sh1-Flot-2 и H460-sh2-Flot-2 с помощью Вестерн-блот гибридазации. Гибридазация блотов с антителами на бета-актин проводилась в качестве контроля.

Б: Сравнительный анализ уровня мРНК генов *FLOT-1*, *CAV-1* и *STOM* с помощью ПЦР в реальном времени. Ген *GAPDH* использовался в качестве референсного. Уровень мРНК нормализовался по контрольной линии H460-sh-GFP (прерывистая линия на обоих графиках). * $p < 0,05$

Таким образом, экспрессия флотиллина-2 влияет на уровень активности систем деградации внеклеточного матрикса и может изменять способность клеток к инвазии.

Исследование экспрессии других рафт-образующих белков в клеточных линиях с подавленной экспрессией флотиллина-2. Одним из важнейших свойств рафт-образующих белков является их способность к олигомеризации, благодаря которой белки одного типа формируют крупные белковые комплексы, влияющие на структуру мембранных микродоменов. Флотиллины способны как к гомо- так и к гетероолигомеризации, причем в отсутствии флотиллина-2 его партнер флотиллин-1 нестабилен и подвергается деградации по протеасомному пути [16]. В свою очередь подавление экспрессии флотиллина-1 также может снижать уровень флотиллина-2 [11], что несомненно говорит о взаимном влиянии данных белков друг на друга.

Чтобы проверить, существует ли такая зависимость в нашей экспериментальной системе, мы оценили уровень белка флотиллина-1 в полученных производных клеточных линиях. В контрольной линии H460-sh-GFP мы обнаружили достаточно высокий эндогенный уровень экспрессии флотиллина-1, который значительно снижался в линиях с подавленной экспрессией флотиллина-2 (рис. 6, А), причем это изменение было более выражено в случае мшРНК sh1-Flot-2, которая сильнее подавляла экспрессию флотиллина-2. Таким образом, на линии H460 РЛ мы подтвердили данные, полученные исследователями на других экспериментальных моделях, и показали, что уровни продукции флотиллина-1 и флотиллина-2 взаимосвязаны друг с другом.

По своему строению, локализации и выполняемым в клетке функциям флотиллины весьма сходны с белками семейств кавеолинов и стоматинов. Предполагается, что флотиллины являются функциональными аналогами кавеолинов и могут замещать их в тех типах клеток (лимфоциты, нейроны), где кавеолины отсутствуют [2]. Однако вопрос о взаимном влиянии белков этих двух семейств в тех типах клеток, где они экспрессируются одновременно, остается практически неизученным. Что касается стоматинов, то совместных исследований их экспрессии с другими рафт-образующими белками ранее не проводилось. Мы проверили, влияет ли изменение экспрессии флотиллина-2 на уровень кавеолина-1 и стоматина в клетках АК легкого человека.

Для этого мы оценили уровень экспрессии кавеолина-1 и стоматина в полученных клеточных линиях. В обеих линиях с подавленной экспрессией флотиллина-2 наблюдалось увеличение количества кавеолина-1 и стоматина, что показано нами впервые (рис. 6, А).

Чтобы проверить, являются ли обнаруженные нами изменения экспрессии рафт-образующих белков транскрипционными, мы оценили относительную экспрессию мРНК генов *FLOT-1*, *STOM* и *CAV-1* в исследуемых клеточных линиях. Как показано на рис. 6Б, относительная экспрессия всех трех генов значимо не изменяется. Следовательно, изменение продукции данных белков не является результатом изменения уровня мРНК, а происходит за счет регуляции трансляции и/или стабильности белковых молекул.

Уменьшение количества флотиллина-1 при подавлении экспрессии флотиллина-2 согласуется с литературными данными о том, что в отсутствие партнера флотиллин-1 подвергается протеасомной деградации. Что касается увеличения количества белков кавеолин-1 и стоматин при нокдауне флотиллина-2, то эти данные указывают на существование компенсаторного пост-трансляционного механизма, регулирующего стабильность молекул аналогов флотиллина-2 в ответ на изменение его уровня экспрессии.

Выводы

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о влиянии флотиллина-2 на такие важнейшие характеристики опухолевых клеток, как скорость пролиферации и миграция. Определение молекулярных механизмов флотиллин-2-зависимой стимуляции данных процессов открывает новые перспективы для поиска дополнительных маркеров одного из самых прогностически неблагоприятных онкологических заболеваний – рака легкого.

Мы также хотим заострить внимание на том, что изменение экспрессии флотиллина-2 сопровождается изменением эндогенного уровня и других рафт-образующих белков, флотиллина-1, кавеолина-1 и стоматина, что, очевидно, изменяет структуру и функционирование мембранных липидных рафтов, и, несомненно, приводит к модификации важнейших путей передачи сигналов, ассоциированных с опухолевой трансформацией и прогрессией. Изучение механизмов взаимного влияния рафт-образующих белков является одной из неисследованных, но крайне актуальных проблем.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-12097 офи-м-2011 и грантами Министерства Образования и Науки Российской Федерации 11.G34.31.0006 и 2012-1.1-12-000-1002-064.

Таблица

Исследование распределения клеточных линий по фазам клеточного цикла с помощью проточного цитофлуориметра.

Стадия клеточного цикла	H460-sh-GFP	H460-sh1-Flot-2	H460-sh2-Flot-2
G ₀ /G ₁	51,7 ¹	53,6	57,6
S	27,5	23,0	23,3
G ₂ /M	14,9	14,0	15,5
Апоптоз	2,9	6,2	1,8

¹Цифры в таблице обозначают процент клеток данной категории от общего числа исследованных клеток.

Литература

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Смертность от злокачественных заболеваний // Вестник РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 19, № 2, Приложение 1. – С. 91–119.
2. Babuke T., Tikkanen R. Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins // Eur J Cell Biol. – 2007. – 86(9). – P. 525–32.
3. Banks-Schlegel S.P., Gazdar A.F., Harris C.C. Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell lines // Cancer Res. – 1985. – 45(3). – P. 1187–97.
4. Browman D.T., Hoegg M.B., Robbins S.M. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers // Trends Cell Biol. – 2007. – 17(8). – P. 394–402.
5. Gomez V., Sese M., Santamaria A. et al. Regulation of aurora B kinase by the lipid raft protein flotillin-1 // J Biol Chem. – 2010. – 285(27). – P. 20683–90.
6. Hazarika P., McCarty M.F., Prieto V.G. et al. Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1 // Cancer Res. – 2004. – 64(20). – P. 7361–9.
7. Knizhnik A.V., Kovaleva O.V., Komelkov A.V. et al. Arf6 promotes cell proliferation via the PLD-mTORC1 and p38MAPK pathways // J Cell Biochem. – 2012. – 113(1). – P. 360–71.
8. Langhorst M.F., Reuter A., Stuermer C.A. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins // Cell Mol Life Sci. – 2005. – 62(19-20). – P. 2228–40.
9. Lin C., Wu Z., Lin X. et al. Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a // Clin Cancer Res. – 2011. – 17(10). – P. 3089–99.
10. Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // Science. – 2010. – 327(5961). – P. 46–50.
11. Ludwig A., Otto G.P., Riento K. et al. Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment // J Cell Biol. – 2010. – 191(4). – P. 771–781.
12. Malumbres M., Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer // Nat Rev Cancer. – 2001. – 1(3). – P. 222–31.
13. Patra S.K. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer // Biochim Biophys Acta. – 2008. – 1785(2). – P. 182–206.
14. Razani B., Woodman S.E., Lisanti M.P. Caveolae: from cell biology to animal physiology // Pharmacol Rev. – 2002. – 54(3). – P. 431–67.
15. Santamaria A., Castellanos E., Gomez V. et al. PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts // Mol Cell Biol. – 2005. – 25(5). – P. 1900–11.
16. Solis G.P., Hoegg M., Munderloh C., Schrock Y. Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains // Biochem J. – 2007. – 403(2). – P. 313–22.
17. Takahashi T., Nau M.M., Chiba I. et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer // Science. – 1989. – 246(4929). – P. 491–4.
18. Williams T.M., Lisanti M.P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis // Am J Physiol Cell Physiol. – 2005. – 288(3). – P. 494–506.
19. Yang M., Hasegawa S., Jiang P. et al. Widespread skeletal metastatic potential of human lung cancer revealed by green fluorescent protein expression // Cancer Res. – 1998. – 58(19). – P. 4217–21.

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



НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.37-006.66-07:575.117.2

*М.С. Чесноков, И.Ф. Кустова, Д.А. Шавочкина, А.Г. Кузнецова и Н.Л. Лазаревич***ЧАСТИЧНАЯ РЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПОНИЖЕНИЕ ВЫРАЖЕННОСТИ ЧЕРТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК ПРОТОКОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА HNF4 α** *ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация***Чесноков Михаил Сергеевич, аспирант лаборатории механизмов прогрессии эпителиальных опухолей НИИ Канцерогенеза***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(499)323-53-22**e-mail:** disasterr19@gmail.com

Статья поступила 11.07.2012, принята к печати 31.08.2012

Резюме

Ядерный рецептор HNF4 α – важный регулятор дифференцировки печени и ряда других органов пищеварительного тракта. Нарушение его экспрессии ассоциировано с прогрессией опухолей печени, почки, желудка и кишечника. Однако значение нарушений его экспрессии в опухолях поджелудочной железы и потенциальные возможности использования модификаций его экспрессии для ингибирования опухолевой прогрессии на сегодняшний день не исследованы. В настоящей работе впервые исследовано влияние экзогенной экспрессии двух групп изоформ HNF4 α , P1 и P2, в дедифференцированных клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека Panc1. Показана HNF4 α -зависимая активация экспрессии основных регуляторов дифференцировки панкреатических клеток PDX1 и PTF1 α . Экзогенная экспрессия HNF4 α сопровождается ослаблением колониеобразующей и усилением миграционной способности клеток Panc1 и приближением клеточного фенотипа к характерному для частично дифференцированных панкреатических клеток-предшественников. Полученные данные дают возможность рассматривать HNF4 α как возможную мишень для разработки новых способов диагностики и терапии этого вида опухолей.

Ключевые слова: протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, HNF4 α , изоформы, экзогенная экспрессия, уровень дифференцировки.

*M.S. Chesnokov, I.F. Kustova, D.A. Shavochkina, A.G. Kuznetzova, N.L. Lazarevich***PARTIAL REDIFFERENTIATION AND DECREASE IN MALIGNANT PROPERTIES OF HUMAN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA CELLS EXPRESSING NUCLEAR RECEPTOR HNF4 α** *FSBI «N. N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

Nuclear receptor HNF4 α is a crucial regulator of differentiation in the liver and several other organs of digestive system. Impairment of its expression is associated with progression of liver, kidney, gastric and colorectal tumors. However the significance of its deregulation in pancreatic tumors and possibility to use the modifications of its expression for inhibition of tumor progression are yet not investigated. In present study the effect of exogenous expression of two groups of HNF4 α isoforms, P1 and P2, in dedifferentiated human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line Panc1 was investigated for the first time. HNF4 α -dependent activation of the key regulators of pancreatic differentiation PDX1 and PTF1 α expression was shown. HNF4 α re-expression was associated with a decrease in colony formation and increase in migration ability of Panc1 cells and phenotypic switch towards partially differentiated pancreatic precursor cells. Obtained data offer a possibility to consider HNF4 α as a possible target for the development of new diagnostic and treatment approaches for pancreatic tumors.

Key words: pancreatic ductal adenocarcinoma, HNF4 α , isoforms, exogenous expression, differentiation level.

Введение

Опухоли поджелудочной железы отличаются чрезвычайно высокой агрессивностью и крайне неблагоприятным прогнозом. 5-летняя выживаемость пациентов с такими опухолями не превышает 6 % [16]. Наиболее злокачественной формой является протоковая аденокарцинома, самый распространенный тип опухолей поджелудочной железы. Высокая смертность при протоковой аденокарциноме обусловлена трудностью ее ранней диагностики, низкой эффективностью существующих методов терапии и очень высокой скоростью прогрессии. У многих пациентов с опухолями поджелу-

дочной железы на момент постановки диагноза уже существуют удаленные метастазы.

Прогрессия опухолевых клеток выражается в ослаблении контроля пролиферации, приобретении способности к инвазии, утрате дифференцировки и других нарушениях. Изменение экспрессии генов, ответственных за эти проявления злокачественного фенотипа опухолевых клеток, в значительной мере определяется изменением активности множества ТФ. В разных типах клеток определяющее действие на транскрипцию генов оказывают различные системы ТФ. Одной из наиболее полно исследованных систем тканеспецифической регуляции транскрипции является сеть ГЯФ.

Эта система включает пять неродственных семейств ТФ, которые регулируют развитие и функции печени, поджелудочной железы, кишечника и ряда других органов [1]. Многочисленные исследования показали, что чрезвычайно важную роль в этой системе играет фактор HNF4 α [9; 15]. Его экспрессия обнаружена в печени, поджелудочной железе, желудке, кишечнике и ряде других органов [18]. Показано, что HNF4 α является регулятором дифференцировки и функциональной активности клеток печени, поджелудочной железы и тонкой кишки [3; 5; 9].

На сегодняшний день описано 12 изоформ фактора HNF4 α , транскрибирующихся с двух независимо регулируемых промоторов, P1 (α 1- α 6) и P2 (α 7- α 12) [13]. Изоформы, транскрибирующиеся с разных промоторов (HNF4 α P1 и HNF4 α P2, соответственно), обладают различными транс-активационными свойствами [19]. Для различных тканей характерна экспрессия разных групп изоформ HNF4 α : например, в нормальных гепатоцитах экспрессируются только изоформы группы HNF4 α P1, а во взрослой поджелудочной железе – группы HNF4 α P2 [18].

Нарушение нормальной экспрессии изоформ HNF4 α в гепатоцитах коррелирует с возникновением и прогрессией гепатоцеллюлярной карциномы. Восстановление экспрессии изоформы HNF4 α 1 в клетках дедифференцированной гепатоцеллюлярной карциномы мыши H33 приводит к частичной реверсии их злокачественного фенотипа [12]. HNF4 α играет роль опухолевого супрессора в клетках кишечника и почки [5; 7]. Описано антипролиферативное влияние HNF4 α на β -клетки поджелудочной железы [6], однако нарушения экспрессии и функций HNF4 α , сопровождающие возникновение и прогрессию опухолей поджелудочной железы и, в частности, протоковой аденокарциномы, практически не исследованы. Дополнительным стимулом к исследованиям этой области стало выявление экспрессии HNF4 α в протоковых клетках. Опухоли, образующиеся из них, отличаются крайне агрессивным фенотипом в силу повышенного пролиферативного потенциала и способности к дедифференцировке с последующей редифференцировкой в другие типы клеток поджелудочной железы [14]. Таким образом, HNF4 α может оказаться потенциальной мишенью для терапии и профилактики опухолей поджелудочной железы, а исследование изменений его экспрессии в клетках протоковой аденокарциномы является актуальным и перспективным направлением молекулярной онкологии.

В настоящей работе показано, что опухолевую трансформацию протоковых клеток поджелудочной железы часто сопровождают нарушения экспрессии изоформ HNF4 α . Впервые описано ослабление злокачественного фенотипа и повышение уровня дифференцировки дедифференцированных клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы при экзогенной экспрессии в них изоформ HNF4 α P1 и HNF4 α P2.

Материалы и методы

Клеточные линии

В работе использованы линии клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека CaPan2, AsPC1, Panc1 и MiaPaCa2 из банка клеточных культур Института цитологии РАН. Для получения лентивирусных частиц использовали линию эмбриональных клеток почки человека HEK293T (Invitrogen, США).

Клетки линий HEK293T, Panc1 и MiaPaCa2 культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США), клетки линий CaPan2 и AsPC1 – в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Среда содержала 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, США), 300 мг/л глутамина (ПанЭко, Россия) и 10 мг/л антибиотика ципрофлоксацина. Культивирование проводили в атмосфере 5% CO₂ при температуре +37 °С. Приблизительно раз в 5–7 дней клетки обрабатывали трипсином и пересевали.

Плазмидные векторы

В работе использовали:

1. Лентивирусные векторы для упаковки вирусных частиц pLP1, pLP2 и pCMV-VSVg (Invitrogen, США).
2. Лентивирусный вектор pLenti6/V5-D-TOPO, содержащий ген устойчивости к бластицидину (Invitrogen, США).
3. Лентивирусные вектора pLenti-HNF4 α 1-FLAG и pLenti-HNF4 α 7-FLAG, экспрессирующие кДНК изоформ HNF4 α 1 и HNF4 α 7, соответственно, и несущие ген устойчивости к бластицидину, полученные ранее в нашей лаборатории на основе вектора pLenti6/V5-D-TOPO.

Получение культур, экспрессирующих изоформы HNF4 α

Клетки линии HEK293T трансфицировали плазмидными векторами, используя метод кальций-фосфатной трансфекции. Три вектора (pLP1, pLP2, pCMV-VSVg) кодировали структурные белки вирусной частицы, четвертый вектор кодировал изоформу HNF4 α 1 или HNF4 α 7, либо нес только ген устойчивости к бластицидину. Культуральную среду, собранную с чашек с трансфицированными клетками HEK293T и содержащую лентивирусные частицы, фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм и вносили в чашки с клетками Panc1. Заражение проводили в течение 3 суток, ежедневно добавляя среду с лентивирусными частицами, после чего проводили селекцию клеток в среде, содержащей 3 мкг/мл бластицидина, в течение 14 суток. После селекции отбирали отдельные клоны, остальные клетки объединяли в смешанные культуры.

ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов

Из клеток исследуемых культур получали образцы тотальной РНК с помощью набора «SV Total RNA Isolation System» (Promega, США) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Концентрацию РНК определяли по оптической плотности раствора, измеренной на спектрофотометре «NanoDrop-1000» (Thermo Scientific, США) при λ 260 нм. Образцы кДНК получали с помощью метода обратной транскрипции, используя M-MLV-обратную транскриптазу, как описано ранее [2]. В реакцию обратной транскрипции брали по 2,5 мкг суммарной РНК.

Для определения уровней экспрессии генов применяли метод ПЦР с праймерами к генам циклофилина А (PPIA), PDX1, PTF1 α и различным участкам гена HNF4 α .

Реакцию с праймерами к PPIA использовали для контроля равенства количества кДНК, взятой в реакцию. Последовательности праймеров, использованных в работе, доступны по запросу.

Подбор праймеров осуществляли в программе Primer3, синтез осуществляла фирма «Синтол», Москва. ПЦР проводили в амплификаторе «Biometra T3

Thermocycler» (Biometra, Германия). Использовали ранее описанную схему постановки ПЦР [2]. В реакцию вносили по 0,1–0,2 мкг кДНК. Температура отжига и число циклов амплификации были подобраны экспериментально для каждой пары праймеров так, чтобы реакция останавливалась в логарифмической фазе. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2,0 %-ном агарозном геле, документировали с помощью системы «UVP Doc-It LS Image Analysis Software» (UVP, США).

Анализ колониеобразующих свойств

В чашки Петри Ø3 см (Greiner Bio One, Германия) вносили по 1000 клеток и культивировали 14 сут. Образовавшиеся колонии клеток фиксировали метанолом при -20°C и окрашивали гематоксилином Майера (BioVitrum, Россия). Для документации и анализа результатов использовали пакет программ «Total Lab 2.01».

Анализ активности синтеза ДНК

Относительную активность синтеза ДНК в исследуемых клетках определяли по включению 5'-бромдезоксипуридина (5'-BrdU), включающегося в синтезируемую ДНК вместо тимина. На чашки Петри высевали по 100000 клеток. Через 1–2 дня после посева (в логарифмической фазе роста) клетки инкубировали 2 ч в среде, содержащей 10 мМ 5'-BrdU. После инкубации клетки фиксировали метанолом при -20 °C 20 минут, обрабатывали 1 %-ным раствором Triton X-100 (Хеликон, Россия) 3 минуты и 4 Н раствором HCl 10 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание блокировали 3%-ным р-ром BSA (Sigma-Aldrich, США) на PBS. Препараты последовательно окрашивали антителами мыши к 5'-BrdU (1 : 100, Zymo Research, США) и антителами кролика к γ-глобулинам мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa 488 (1 : 200, Invitrogen, США). Долю клеток, меченых 5'-BrdU, подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioplan 2 (Carl Zeiss, США).

Определение кинетики роста клеточных культур

В лунки 96-луночного планшета вносили по 2000 клеток, инкубировали планшеты при 37°C в атмосфере 5 %-ного CO₂ в течение 3; 24; 72 и 96 ч. После инкубации определяли количество клеток в лунках планшета с помощью набора для определения клеточной пролиферации «CyQUANT NF Cell Proliferation Assay Kit» (Invitrogen, США) согласно протоколу, предлагаемому изготовителем. Интенсивность флуоресценции определяли с помощью планшетного считывателя «Plate CHAMELEON V» (Hidex Ltd., Финляндия). Для возбуждения флуоресценции использовали свет с λ495 нм, регистрировали излучение с λ535 нм.

Анализ способности к направленной миграции

В лунки 24-луночного планшета устанавливали вставки для определения направленной миграции в камере Бойдена «BD Falcon Cell Culture Insert» (BD Biosciences, США) с размером пор 8,0 мкм. В верхнюю камеру вносили 10000 клеток в среде, не содержащей сыворотки. В нижнюю камеру вносили среду, содержащую 5% фетальную телячью сыворотку в качестве хемоаттрактанта. Планшет с камерами инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 16 ч. После инкубации

удаляли клетки из верхней камеры ватной палочкой, клетки на нижней стороне мембраны окрашивали 2% раствором кристаллвиолета и подсчитывали при помощи микроскопа.

Статистическая обработка данных

Все эксперименты выполняли не менее, чем в трех повторностях. Данные обрабатывали в программном пакете «Microsoft Office Excel 2003». Для определения достоверности отличий использовали двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями.

Результаты и обсуждение

Изменения экспрессии изоформ HNF4α были исследованы в линиях протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека с различным уровнем дифференцировки: CaPan2, AsPc1, Panc1, MiaPaCa2. Линия CaPan2 состоит из высокодифференцированных клеток, сохраняющих эпителиальную морфологию; линия AsPc1 характеризуется умеренно-дифференцированным фенотипом; для линий Panc1 и MiaPaCa2 характерен крайне низкий уровень дифференцировки и фибробластоподобная морфология [17]. Методом ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к группам изоформ HNF4αP1 и HNF4αP2 (рис. 1) было установлено, что в высокодифференцированной линии CaPan2 экспрессируются изоформы HNF4αP2, характерные для нормальной поджелудочной железы. В клетках умереннодифференцированной линии AsPc1 активируется экспрессия несвойственной для поджелудочной железы группы изоформ HNF4αP1. Для низкодифференцированных линий Panc1 и MiaPaCa2 характерно подавление экспрессии обеих групп изоформ HNF4α (рис. 2). Эти данные указывают на то, что, как и в ряде других эпителиальных тканей, дедифференцировка клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы ассоциирована с нарушением нормальной экспрессии изоформ HNF4α.

Для исследования влияния экзогенной экспрессии HNF4α на уровень дифференцировки и биологические характеристики клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека была использована дедифференцированная линия Panc1, в которой экспрессия изоформ HNF4α не выявляется. Поскольку изоформы групп HNF4αP1 и HNF4αP2 обладают разными транс-активирующими свойствами, были отдельно исследованы эффекты, вызываемые экспрессией как HNF4αP1, так и HNF4αP2 изоформ. С помощью лентивирусной инфекции с последующей селекцией на антибиотике бластицидине нами были получены отдельные клоны и смешанные культуры линии Panc1, экзогенно экспрессирующие изоформы HNF4α1 (группа изоформ P1) и HNF4α7 (группа изоформ P2). Из всех полученных культур была выделена РНК и методом ОТ-ПЦР проведено сравнение уровней экспрессии гена HNF4α (результаты не представлены). В качестве контрольной культуры использовали клетки линии Panc1, не экспрессирующие экзогенный HNF4α (далее «Panc1-K»). Для дальнейших исследований из каждого варианта были выбраны клоны (далее обозначены «cb») и смешанные линии (далее обозначены «mix») с наиболее высокими уровнями экспрессии соответствующего трансгена (далее «Panc1-HNF4α1», «Panc1-HNF4α7»). Повышение синтеза HNF4α в полученных культурах было подтверждено методом иммуноблоттинга с антителами к белку HNF4α, специфическими к консервативной последовательности всех изоформ (результаты не представлены).

Методом ОТ-ПЦР в полученных культурах были проанализированы уровни экспрессии отдельных изоформ HNF4 α , а также уровни экспрессии двух ключевых факторов дифференцировки клеток поджелудочной железы, PDX1 и PTF1 α .

Экспрессию отдельных изоформ HNF4 α определяли, используя праймеры, фланкирующие переменные участки гена. Праймеры HNF4 α P1, фланкирующие участок, содержащий вставку длиной 90 п. н., характерную для изоформ α 4- α 6, были использованы для определения суммарной экспрессии изоформ HNF4 α 1- α 3 (продукт длиной 139 п. н.) и HNF4 α 4- α 6 (229 п. н.). Праймеры HNF4 α P2 использовали для определения суммарного уровня экспрессии группы изоформ HNF4 α 7- α 12. Для определения уровней экспрессии изоформ HNF4 α 2, HNF4 α 5, HNF4 α 8 и HNF4 α 11 внутри групп использовали праймеры HNF4 α 2, позволяющие по размеру ПЦР-продуктов определить наличие вставки длиной 30 п. н., отличающей изоформы α 2, α 5, α 8 и α 11 от α 1, α 4, α 7 и α 10, соответственно. Праймеры HNF4 α 3 использовали для выявления изоформ HNF4 α 3, HNF4 α 6, HNF4 α 9 и HNF4 α 12, отличающихся альтернативной последовательностью 3'-конца мРНК (рис. 1).

Результаты ОТ-ПЦР приведены на рис. 3. Как видно из рисунка, экзогенная экспрессия изоформы HNF4 α 1 в клетках Panc1 не вызывает активации экспрессии изоформ группы HNF4 α P2, характерных для нормальных протоковых клеток поджелудочной железы [14]. Экспрессии изоформ HNF4 α 2- α 6 в исследованных культурах HNF4 α 1 обнаружено не было (результаты для HNF4 α 3 и HNF4 α 6 не представлены).

Реэкспрессия изоформы HNF4 α 7 в клетках Panc1 не сопровождается активацией транскрипции изоформ группы HNF4 α P1. В культурах Panc1-HNF4 α 7 обнаружена активация эндогенной экспрессии изоформы HNF4 α 8, описанной в нормальной ткани поджелудочной железы [8]. Восстановление эндогенной экспрессии с промотора P2 свидетельствует о том, что подавление активности гена HNF4 α , наблюдаемое в линии Panc1, не связано с нарушением последовательности гена или его промотора P2 и, по всей видимости, осуществляется на уровне транскрипции. Это указывает на возможность реактивации этого гена в опухолевых клетках.

Во всех исследованных культурах, экспрессирующих изоформы HNF4 α 1 или HNF4 α 7, нами была обнаружена активация экспрессии генов PDX1 и PTF1 α , кодирующих два основных регулятора дифференцировки панкреатических клеток [4]. Исчезновение экспрессии этих генов характерно для низкодифференцированных клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, их реактивация указывает на повышение уровня дифференцировки клеток линий Panc1-HNF4 α 1 и Panc1-HNF4 α 7 по сравнению с контрольной линией, не экспрессирующей HNF4 α . HNF4 α -зависимая активация PDX1 и PTF1 α описана нами впервые, идентификация молекулярных механизмов этого процесса требуют дальнейших исследований.

Повышение уровня дифференцировки культур Panc1, экспрессирующих изоформы HNF4 α , сопровождается изменением транскрипционной программы, выполняющейся в клетке. Такие изменения могут приводить к значительным изменениям биологических характеристик клеток, таких как колониеобразующая способность, пролиферативная активность и подвижность. Анализ этих клеточных

свойств позволяет оценить возможные изменения злокачественного фенотипа исследуемых клеток и таким образом установить онкогенное или опухоле-супрессорное влияние исследуемого фактора.

Для определения устойчивости опухолевых клеток к аноикису, их способности к адгезии на субстрате и образованию очага пролиферации в условиях *in vitro* был использован клоногенный тест, основанный на подсчете количества колоний, образуемых исследуемыми клетками в условиях высокого разведения. Как показано на рис. 4, клетки культур Panc1, экзогенно экспрессирующих изоформы HNF4 α , обладают пониженной способностью к образованию колоний из одиночных клеток. Принципиальных различий между эффектами, оказываемыми на исследованные линии экзогенными изоформами HNF4 α 1 и HNF4 α 7, выявлено не было.

Пролиферативные свойства клеток культур Panc1-HNF4 α были исследованы с помощью двух методов: определения количества клеток культур на стадии логарифмического роста и подсчета доли клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, по включению в синтезируемую ДНК 5'-BrdU. Полученные результаты приведены на рис. 5. Ни в скорости роста клеточных культур, ни в доле клеток, активно синтезирующих ДНК, значительных изменений для клеток Panc1, экспрессирующих изоформы HNF4 α , по сравнению с культурой Panc1-K, обнаружено не было. Слабое повышение ДНК-синтетической активности в клетках Panc1-HNF4 α 1 не приводит к значимым изменениям кинетики роста этих культур относительно линии Panc1-K, что говорит о независимости пролиферативных свойств этих клеток от уровня экспрессии изоформ HNF4 α .

Эксперименты, проведенные ранее на различных линиях опухолевых клеток, продемонстрировали, что экзогенная экспрессия изоформ HNF4 α приводит к замедлению пролиферации клеток линий H33 (гепатокарцинома мыши), HEK293 (эмбриональный эпителий почки человека) и INS-1 (трансформированные β -клетки поджелудочной железы крысы) [6; 7; 12]. Возможно, отсутствие влияния экспрессии HNF4 α на пролиферацию в исследуемой системе обусловлено дополнительными нарушениями HNF4 α -зависимых путей регуляции клеточного цикла в линии Panc1.

Для сравнения миграционных свойств HNF4 α -экспрессирующих и контрольных культур Panc1 был проведен тест на способность к направленной миграции в модифицированных камерах Бойдена под действием аттрактанта. Результаты, полученные в процессе определения миграционного потенциала исследуемых культур, приведены на рис. 6. Экзогенная экспрессия обеих изоформ HNF4 α в клетках Panc1 сопровождается значительным повышением их способности к направленной миграции по градиенту аттрактанта по сравнению с клетками, не экспрессирующими HNF4 α . Этот неожиданный результат плохо сочетается с приведенными выше данными о частичной редифференцировке клеток культур Panc1-HNF4 α и ослаблении их колониеобразующего потенциала, которые давали повод предполагать, что реэкспрессия HNF4 α приведет к ослаблению миграционного потенциала. Однако полученные данные согласуются с информацией о значительном повышении способности клеток Panc1 к направленной миграции при экзогенной экспрессии в них фактора PDX1 [11], активирующегося также в HNF4 α -экспрессирующих культурах Panc1.

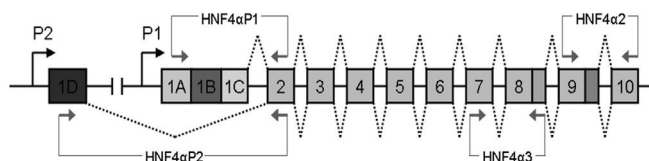


Рис. 1. Схема строения гена HNF4α. Указаны варибельные участки и места связывания праймеров для определения экспрессии различных изоформ.

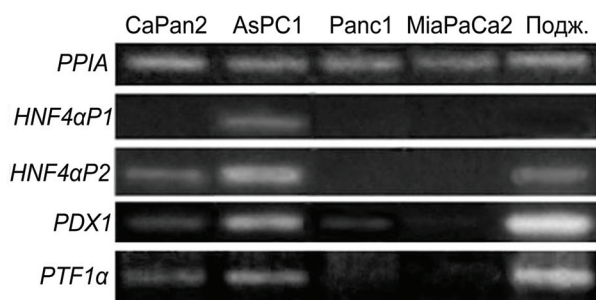


Рис. 2. Изменения уровней экспрессии изоформ HNF4α и регуляторов дифференцировки поджелудочной железы в линиях протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека разной степени дифференцировки. Экспрессия групп изоформ HNF4α и факторов PDX1 и PTF1α в клеточных линиях CaPan2, AsPC1, Panc1, MiaPaCa2 и в ткани нормальной поджелудочной железы человека (Подж.) Электрофорез продуктов ПЦР в 2,0% агарозном геле. Экспрессия гена PPIA приведена для контроля количества кДНК, взятой в реакцию

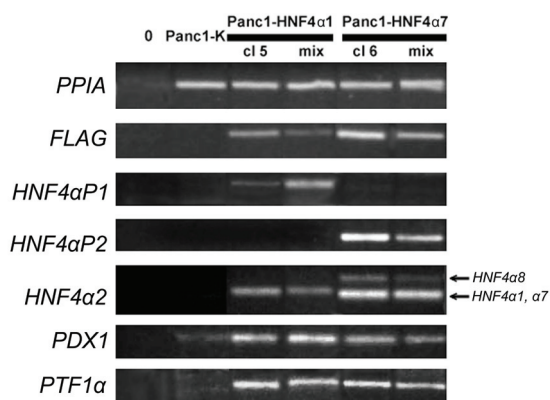


Рис. 3. Экзогенная экспрессия изоформ HNF4α в клетках линии Panc1 приводит к активации экспрессии регуляторов дифференцировки PDX1 и PTF1α. ОТ-ПЦР анализ уровней экспрессии групп изоформ HNF4α и генов PDX1 и PTF1α в HNF4α-экспрессирующих клетках Panc1-HNF4α1 и Panc1-HNF4α7 и контрольной линии Panc1-K. Электрофорез продуктов ПЦР в 2,0% агарозном геле. Экспрессия гена PPIA приведена для контроля количества кДНК, взятой в реакцию.

Предполагаемый механизм активации миграционной активности через PDX1, однако, может быть не единственным, так как четкой корреляции между уровнями экспрессии PDX1 и относительным повышением количества мигрировавших в камеру Бойдена клеток не наблюдается.

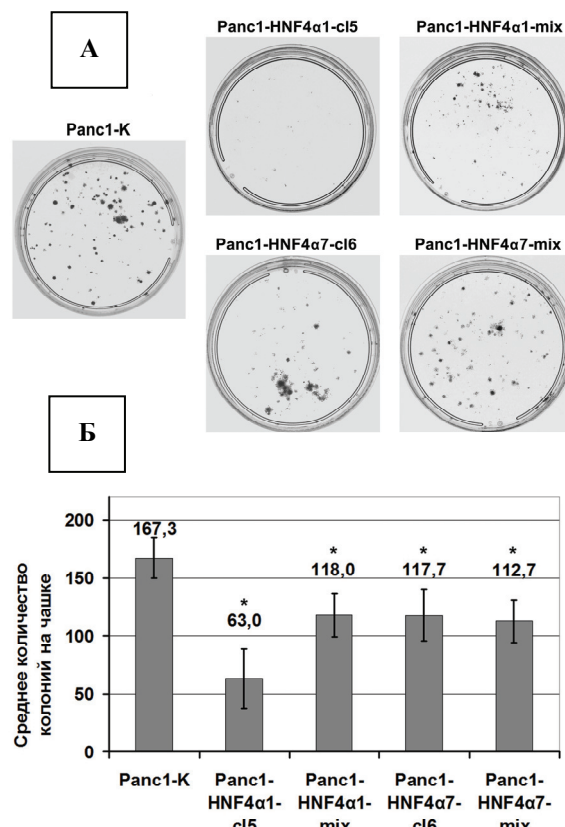


Рис. 4. Экзогенная экспрессия HNF4α сопровождается снижением колониеобразующей активности клеток Panc1.

А: внешний вид чашек Петри с колониями клеток; Б: количество колоний, формируемых клетками HNF4α-экспрессирующих культур и контрольной культуры в условиях высокого разведения (1000 клеток на чашку диаметром 3 см). * – $P < 0,05$.

Для адекватного истолкования обнаруженных изменений следует обратиться к гипотезе о том, что протоковые клетки поджелудочной железы могут играть роль мультипотентных клеток-предшественников. Усиление миграции панкреатических клеток-предшественников описано, например, при дифференцировке клеток островков Лангерганса [10]. Для подвижных панкреатических клеток-предшественников, находящихся в фазе частичной дифференцировки, характерна одновременная экспрессия факторов PDX1 и PTF1α [20]. Сходный спектр экспрессии этих транскрипционных факторов наблюдается в культурах Panc1, экспрессирующих изоформы HNF4α. Ввиду этого наблюдаемое увеличение миграционного потенциала может быть истолковано как приближение свойств клеток к присущим панкреатическим клеткам-предшественникам.

Заключение

Полученные результаты указывают на существенную роль транскрипционного фактора HNF4α в регуляции биологических свойств и экспрессии генов в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека. Экзогенная экспрессия изоформ HNF4α в клетках линии Panc1 сопровождается активацией генов PDX1 и PTF1α, кодирующих основные регуляторы дифференцировки панкреатических клеток.

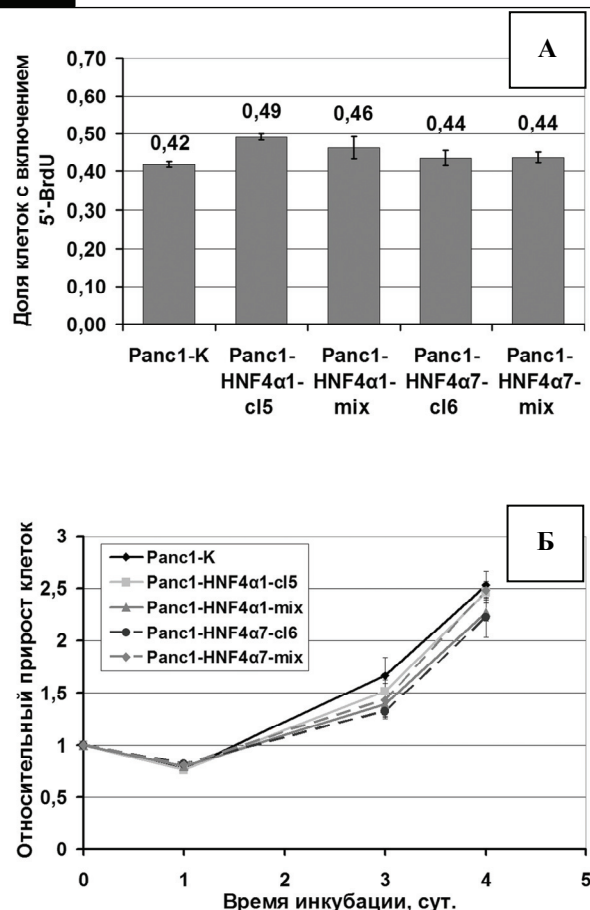


Рис. 5. Экзогенная экспрессия HNF4α не оказывает существенного влияния на пролиферативные свойства клеток Panc1.

А: интенсивность синтеза ДНК, определенная по включению 5'-BrdU в синтезирующуюся ДНК;

Б: кинетика роста исследованных культур. Количество клеток нормализовано относительно количества клеток, прикрепившихся через 3 часа после посева.

HNF4α-экспрессирующие культуры клеток Panc1 обладают пониженной способностью к колониобразованию по сравнению с контрольной культурой. В то же время экзогенная экспрессия изоформ HNF4α приводит к усилению способности клеток Panc1 к направленной миграции.

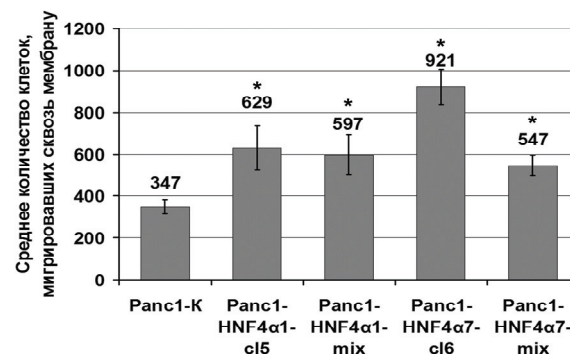


Рис. 6. HNF4α-экспрессирующие клетки Panc1 обладают повышенной способностью к направленной миграции. Приведено среднее количество клеток, мигрировавших сквозь мембрану камеры Бойдена с размером пор 8,0 мкм. * – P<0,05.

Описанные изменения характерны для панкреатических мультипотентных клеток-предшественников, находящихся на стадии частичной дифференцировки. Таким образом, экзогенная экспрессия HNF4α в дедифференцированных клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека приводит к их частичной редифференцировке и ослаблению злокачественного фенотипа. Это первое указание на то, что в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы восстановление экспрессии HNF4α или блокирование сигнальных путей, определяющих его транскрипционную репрессию, могут вызывать частичную редифференцировку и реверсию злокачественного фенотипа. Ранее на модели гепатоцеллюлярной карциномы нами было показано, что восстановление экспрессии HNF4α может быть достигнуто путем блокирования ряда внутриклеточных сигнальных путей, активированных в опухолевых клетках, например сигнального каскада, индуцируемого трансформирующим фактором роста β [2]. Дальнейшие исследования в этой области позволят детальнее понять ключевые механизмы развития этого типа опухолей, которые могут быть использованы для разработки новых подходов к терапии и диагностике опухолевых заболеваний поджелудочной железы.

Работа поддержана грантами Министерства образования и науки (№ 12.740.11.0196, шифр 2012-1.1-12-000-1002-064), Российского фонда фундаментальных исследований 10-04-01504-а и благотворительного фонда «Протек»

Литература

1. Лазаревич Н.Л., Флейшман Д. И. Тканеспецифические транскрипционные факторы в прогрессии эпителиальных опухолей // Биохимия. – 2008. – 73. – С. 713–34.
2. Макарова М.В., Доннер Н.Е., Флейшман Д.И. и др. Частичная реверсия злокачественного фенотипа клеток дедифференцированной гепатокарциномы мыши инактивацией трансформирующего фактора роста β2 // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 56–9.
3. Boj S.F., Parrizas M., Maestro M.A., Ferrer J. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells // Prot. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – 98. – P. 14481–6.
4. Burlison J.S., Long Q., Fujitani Y. et al. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells // Dev. Biol. – 2008. – 316. – P. 74–86.
5. Cattin A.L., Le Beyec J., Barreau F. et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium // Mol. Cell. Biol. – 2009. – 29. – P. 6294–308.
6. Erdmann S., Senkel S., Arndt T. et al. Tissue-specific transcription factor HNF4alpha inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 beta-cell line // Biol. Chem. – 2007. – 388. – P. 91–106.
7. Grigo K., Wirsing A., Lucas B. et al. HNF4 alpha orchestrates a set of 14 genes to down-regulate cell proliferation in kidney cells // Biol. Chem. – 2008. – 389. – P. 179–87.

8. Hansen S.K., Párrizas M., Jensen M.L. et al. Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function // J. Clin. Invest. – 2002. – 110. – P. 827–33.
9. Hayhurst G.P., Lee Y.H., Lambert G. et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis // Mol. Cell Biol. – 2001. – 21. – P. 1393–403.
10. Kim S.K., Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function // Genes Dev. – 2001. – 15. – P. 111–27.
11. Koizumi M., Doi R., Toyoda E. et al. Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer // Surgery. – 2003. – 134. – P. 260–6.
12. Lazarevich N.L., Cheremnova O.A., Varga E.V. et al. Progression of HCC in Mice Is Associated With a Downregulation in the Expression of Hepatocyte Nuclear Factors // Hepatology. – 2004. – 39. – P. 1038–47.
13. Nakhei H., Lingott A., Lemm I., Ryffel G.U. An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4alpha predominates in undifferentiated murine cell types // Nucleic Acids Res. – 1998. – 26. – P. 497–504.
14. Nammo T., Yamagata K., Tanaka T. et al. Expression of HNF-4alpha (MODY1), HNF-1beta (MODY5), and HNF-1alpha (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas // Gene Expr. Patterns. – 2008. – 8. – P. 96–106.
15. Parviz F., Matullo C., Garrison W.D. et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis // Nat. Genet. – 2003. – 34. – P. 292–6.
16. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2012 // CA Cancer J. Clin. – 2012. – 62. – P. 10–29.
17. Sipos B., Möser S., Kalthoff H. et al. A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform // Virchows Arch. – 2003. – 442. – P. 444–52.
18. Tanaka T., Jiang S., Hotta H. et al. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer // J. Pathol. – 2006. – 208. – P. 662–72.
19. Torres-Padilla M.E., Sladek F.M., Weiss M.C. Developmentally Regulated N-Terminal Variants of the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4a Mediate Multiple Interactions through Coactivator and Corepressor-Histone Deacetylase Complexes // J. Biol. Chem. – 2002. – 277. – P. 44677–87.
20. Zhou Q., Law A.C., Rajagopal J. et al. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis // Dev. Cell. – 2007. – 13. – P. 103–14.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 616-006.81-097:615.371/.372

Н.В. Голубцова, Е.В. Степанова, А.Е. Бармашов, О.С. Бурова, К.А. Барышников, И.Н. Григорьева, М.А. Барышникова, М.В. Огородникова, Г.З. Чкадуа, П.К. Иванов, И.Н. Михайлова, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИТЕЛ
У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ**
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контактная информация:

Голубцова Наталья Валерьевна, научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

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

e-mail: ngolubcova@mail.ru

Статья поступила 11.07.2012, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

В данной работе было проведено исследование образования противоопухолевых антител в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой, получавших аутологичную дендритную вакцину (n=26) и вакцину «Мелавак» (n=9). Определение наличия в сыворотке крови антител проводилось с использованием методов РИФ и ФИЦХ на клеточных линиях меланомы человека mel Kor и mel Ibr. Методом РИФ показано, что связывание IgM- и IgG-антител в сыворотке крови вакцинированных больных носит неспецифический характер. Обнаружено наличие специфических антител против меланомных антигенов методом ФИЦХ в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой, получавших вакцину «Мелавак». Окрашивание наблюдалось в цитоплазме клеток.

Ключевые слова: иммунная система, вакцина, дендритные клетки, иммуноглобулины, меланома.

N.V. Golubzova, E.V. Stepanova, A.E. Barmachov, O.C. Burova, K.A. Baryshnikov, I.N. Grigorieva, M.A. Baryshnikova, M.V. Ogorodnikova, G.Z. Chkadua, P.K. Ivanov, I.N. Mikhailova, L.V. Demidov, A.Yu. Baryshnikov
**DETERMINATION OF SPECIFIC ANTITUMOR ANTIBODIES
IN PATIENTS WITH DISSEMINATED MELANOMA DURING VACCINE THERAPY**
FBSI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

Abstract

The present work studied the formation of antitumor antibodies in the serum of patients with metastatic melanoma treated with autologous dendritic vaccine (n = 26) and «Melavak» vaccine (n = 9). Determination of the presence of serum antibodies was performed using methods RIF and FICA on human melanoma cell lines and mel Kor mel Ibr. RIF method shown that binding of IgM-and IgG-antibodies in the serum of vaccinated patients is nonspecific. Revealed the presence of specific antibodies against melanoma antigens by FICA in the serum of patients with metastatic melanoma, the vaccine «Melavak». Staining was observed in the cytoplasm of cells.

Key words: immune system, vaccine, dendritic cells, immunoglobulin, melanoma.

Введение

Благодаря развитию биотехнологии, активно разрабатываются новые методы, направленные на активацию естественного противоопухолевого иммунитета. Большое место в исследованиях этой области занимает вакциноterapia. По мнению многих исследователей, активация естественных защитных иммунных механизмов может произойти при введении вакцин, содержащих опухолеассоциированные антигены [2–6]. Так, в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН на основе трансфицированных генами tag7 и ГМ-КСФ клеточных линий меланомы [9] и нагруженных опухолевым лизатом дендритных клеток больных меланомой созданы и охарактеризованы цельноклеточные вакцины: аутологичные (Аутологичная/tag-7, Дендритная) и аллогенные («Аллоген», «Мелавак»). Проведенные доклинические и клинические исследования этих вакцин [7; 8; 10–12] способствовали выработке стратегического направления противоопухолевой вакцинотерапии, тем самым повышая эффективность лечения онкологических больных [2–12].

Изучение гуморального иммунного ответа к ОАА привлекло внимание ученых еще в восьмиде-

сятых годах прошлого столетия [1; 13; 14]. Многочисленные антигены на клеточной поверхности индуцировали развитие гуморального иммунного ответа, в некоторых случаях появление циркулирующих иммунных комплексов. Появление методов анализа с применением количественных и полуколичественных аналитических систем позволило идентифицировать специфические антитела ко многим внутриклеточным и поверхностным опухолевым белкам. Следует отметить, что роль специфичных гуморальных факторов в противоопухолевом иммунитете неоднозначна. Природа блокирующего фактора была доказана еще 30 лет назад и с учетом специфичности его действия была сформулирована концепция блокирующих антител. Согласно этой концепции, гуморальная и клеточная формы иммунного ответа на опухоль находятся в своеобразных антагонистических взаимоотношениях. Иммунные лимфоциты распознают антигенные детерминанты опухолевых клеток и уничтожают их. Гуморальные антитела, соединяясь с этими же детерминантами, не способны оказывать вредное влияние на опухолевые клетки, но экранируют их от цитопатогенного действия иммунных лимфоцитов [13]. В процессе опухолевой прогрессии, при угнетении или отсутствии киллер-

ного эффекта Т-лимфоцитов, деструкция трансформированных клеток может осуществляться за счет цитотоксичности, опосредованной гуморальными антителами [1]. Роль гуморальных антител в противоопухолевой защите, по данным литературы, противоречива. В некоторых работах показано, что противоопухолевые антитела содействуют прогрессивному росту опухоли, в других – выявлено их защитное действие.

Так, по данным отечественной литературы показано, что тенденция к увеличению продукции противоопухолевых антител характерна для пациентов, у которых не удалось достичь клинического эффекта на фоне проведения вакцинотерапии [15], а по данным зарубежных авторов выявлено наличие прямой корреляции между величиной сывороточных IgM и IgG к ОАА и уровнем общей и безрецидивной выживаемости пациентов в ходе вакцинотерапии [18]. Ряд авторов показали, что у больных меланомой в процессе иммунотерапии обнаруживаются антитела против тиреоглобулина, ядерного белка [17], углеводных антигенов, белка ТА 90 [18], которые имеют прогностическое значение.

В процессе противоопухолевой вакцинотерапии в сыворотке крови больных меланомой могут образовываться антитела против антигенов, которые экспрессируются в клетках, используемых для вакцины. Изучение гуморального иммунного ответа у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии представляет несомненный интерес в исследовании механизмов «ухода» опухоли от иммунологического надзора при мониторинге больных меланомой с целью прогноза заболевания и иммунологической оценки эффективности проводимой противоопухолевой терапии.

Цель нашего исследования – выявление образования противоопухолевых антител в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом, и вакциной «Мелавак» на основе аллогенных генно-модифицированных опухолевых клеток.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы сывороток крови 26 больных диссеминированной меланомой, которые после хирургического удаления опухоли получали вакцину на основе аутологичных дендритных клеток, образцы сывороток крови 9 больных диссеминированной меланомой, которые после хирургического удаления опухоли получали вакцину «Мелавак». В качестве контроля использовались образцы сывороток крови 9 больных меланомой без вакцинотерапии и образцы сывороток крови 6 здоровых доноров.

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аутологичных дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом *in vitro* [16].

Также в качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина «Мелавак» на основе аллогенных опухолевых клеток метастатической линии меланомы человека, трансфицированной геном ГМ КСФ.

Оценка связывания IgM и IgG антител проводилась методом РИФ и методом ФИЦХ с использованием поликлональных антител против человеческих иммуноглобулинов IgG, конъюгированных с FITC (Goat F(ab')₂ ANTI HUMAN IgG:FITC) и поликлональных антител против человеческих иммуно-

лобулинов IgM, конъюгированных с PE (Goat F(ab')₂ ANTI HUMAN IgM:PE) («Serotec», Германия).

Для проведения РИФ и ФИЦХ использовались клеточные линии меланомы человека *mel Kor* и *mel Ibr*, различающиеся экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов. Результаты оценивали по уровню и частоте экспрессии антиген-положительных клеток.

Реакция непрямо́й иммунофлуоресценции

Клеточные линии меланомы человека *mel Kor* и *mel Ibr* культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 2мМ глутамина, антибиотики (100 МЕ/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина).

5×10^5 клеток *mel Kor* и *mel Ibr* инкубировали с 20 мкл образцами сыворотки крови пациентов и доноров в разведении 1:50 в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего 10 мин отмывали в 1 мл фосфатно-солевого буфера при 1500 об/мин. К осадку клеток добавляли 20 мкл вторичных поликлональных антител против человеческих IgG, конъюгированных с FITC, либо 10 мкл поликлональных антител против человеческих IgM, конъюгированных с PE, и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. После этого клетки дважды отмывали в 1 мл фосфатно-солевого буфера в тех же условиях, осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл 1%-ного р-ра формалина и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Beckton Dickinson, США).

Флуоресцентный иммуноцитохимический анализ

Подготовка опухолевых клеток к иммуноцитохимическому анализу

Для экспериментов клетки меланомы линий *mel Kor* и *mel Ibr* использовали при конfluентности 70–80 %. Клетки промывали 2 раза в холодном PBS и осаждали на стекла с помощью цитоцентрифуги. Полученные стекла с осажденными клетками хранили при –20 °С не более 2 нед.

Проведение флуоресцентного иммуноцитохимического анализа

Клетки фиксировали в 96%-ном C₂H₅ОН в течение 5 мин, затем в 100%-ном ацетоне – 3 мин. Препарат инкубировали в течение 10 мин в фосфатно-солевом буфере, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина для забивки неспецифического связывания. Затем клетки инкубировали с сыворотками крови больных в разведении 1:10 в течение 18 ч при температуре 4 °С.

В качестве вторичных антител использовали таковые против IgG и IgM человека, меченые FITC и PE, соответственно. Препарат докрашивали Hoechst-33258 (2 мкг/мл). Препарат анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon 80i (Япония) при увеличении 400×.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета программ EXCEL 2003, STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования выявлено неспецифическое связывание IgM- и IgG-антител в образцах сыворотки крови больных и здоровых доноров методом непрямо́й РИФ. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Результаты определения специфических IgM в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии, ($M \pm m$), %, РИФ

Группы пациентов	n AG ⁺ к-к в <i>mel Kor</i> , (%)		n AG ⁺ к-к в <i>mel Ibr</i> , (%)	
	Срок лечения			
	До	В ходе	До	В ходе
1.Дендритная вакцина (n=26)	9,4±1,6	9,0±1,4	5,7±2,0	4,9±1,9
2.Вакцина «Мелавак» (n=9)	6,0±1,6	5,7±2,3	7,0±3,0	6,8±2,2
3.Контрольная группа 1* (n=9)	9,6±2,9		5,6±1,2	
4.Контрольная группа 2** (n=6)	4,1±0,7		3,5±0,5	
*больные меланомой без вакцинотерапии				
**здоровые доноры				

Таблица 2

Результаты определения специфических IgG в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии, ($M \pm m$), %, РИФ

В процессе вакцинотерапии, (N = 11), %, ГГ+

Группы пациентов	n AG ⁺ к-к в <i>mel Kor</i> , (%)		n AG ⁺ к-к в <i>mel Ibr</i> , (%)	
	Срок лечения			
	До	В ходе	До	В ходе
1. Дендритная вакцина (n=26)	3,6±2,2	3,5±2,5	4,5±2,3	4,8±3,1
2. Вакцина «Мелавак» (n=9)	1,1±0,6	1,8±0,9	1,1±0,9	1,2±0,7
3. Контрольная группа 1* (n=9)	2,8±0,5		6,1±1,4	
4. Контрольная группа 2** (n=6)	0,8±0,5		0,9±0,6	
*больные меланомой без вакцинотерапии				
**здоровые доноры				

Таблица 3

Результаты определения специфических IgM в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии, ($M \pm m$), %, ФИЦХ

Группы пациентов	n АГ ⁺ к-к в <i>mel Kor</i> , (%)		n АГ ⁺ к-к в <i>mel Ibr</i> , (%)	
	Срок лечения			
	До	В ходе	До	В ходе
1.Дендритная вакцина (n=20)	Не обнаружено		Не обнаружено	
2.Вакцина «Мелавак» (n=9)	(n=7) 2+, 40%	2+, 70%	(n=7) 2+, 40%	2+, 60%
3.Контрольная группа 1* (n=9)	Не обнаружено		Не обнаружено	
4.Контрольная группа 2** (n=6)	Не обнаружено		Не обнаружено	
*больные меланомой без вакцинотерапии				
**здоровые доноры				

Таблица 4

Результаты определения специфических IgG в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии, ($M \pm m$), %, ФИЦХ

Группы пациентов	***ИО, % АГ ⁺ к-к в <i>mel Kor</i> , (%)		ИО, % АГ ⁺ к-к в <i>mel Ibr</i> , (%)	
	Срок лечения			
	До	В ходе	До	В ходе
1.Дендритная вакцина (n=20)	Не обнаружено		Не обнаружено	
2.Вакцина «Мелавак» (n=9)	(n=4) 1+, 20%	1+, 40%	Не обнаружено	(n=1) 1+, 30%
3.Контрольная группа 1* (n=9)	(n=2) 1+, 20%		Не обнаружено	
4.Контрольная группа 2** (n=6)	Не обнаружено		Не обнаружено	
*больные меланомой без вакцинотерапии **здоровые доноры ***ИО – интенсивность окрашивания				

Как следует из табл. 1, был выявлен небольшой процент антиген-положительных клеток, реагирующих с сывороткой крови доноров и больных. Однако эти результаты следует рассматривать как неспецифические, так как линии клеток являются мономорфными, и при специфической реакции нужно было ожидать 100%-ную экспрессию антигенов. Это заключение подчеркивают результаты определения IgG-антител (табл. 2), при которых специфическая реакция в сыворотке крови здоровых доноров и в образцах сыворотки крови больных до и в ходе лечения отсутствовала.

Таким образом, специфических IgM и IgG-антител против поверхностных антигенов меланомы в образцах сыворотки крови вакцинированных больных диссеминированной меланомой методом непрямой РИФ выявлено не было.

Было проведено исследование наличия антител против цитоплазматических антигенов в сыворотке крови больных методом ФИЦХ (табл. 3 и 4).

Как следует из табл. 3 в образцах сыворотки крови здоровых доноров, больных меланомой без вакцинотерапии и больных, получавших дендритную вакцину, реакция с клетками *mel Kog* была отрицательной. Однако положительная реакция IgM-антител с этими клетками выявлена в образцах сыворотки крови у 7 из 9 больных меланомой, получавших вакцину «Мелавак». Антитела обнаруживались после первой вакцинации (рис. 1; см. вклейку). Обнаружена отрицательная реакция с клетками *mel Ibr* IgM-антител в образцах сыворотки крови доноров и больных меланомой, получавших дендритную вакцину и положительная реакция IgM-антител в образцах сыворотки крови у 7 из 9 больных меланомой, получавших вакцину «Мелавак» (рис. 2).

Как следует из табл. 4, была выявлена положительная реакция специфических IgG-антител с клетками *mel Kor* в образцах сыворотки крови у 4 из 9 больных меланомой, получавших вакцину «Мелавак» (рис. 3) и у 2 из 9 больных меланомой без вакцинотерапии.

Литература

1. Агеев А.И., Гордиенко С.П., Саканделидзе О.Г. Иммунизация и терапия экспериментальных опухолей. – Кишинев: Штиница, 1982. – 310 с.
2. Балдуева И.А. Противоопухолевые вакцины // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, №3. – С. 157–66.
3. Барышников А.Ю. Противоопухолевые вакцины // Материалы Всероссийской научно-практической конференции. РБЖ. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 12–4.
4. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. – Т. 2. – С. 59–63.
5. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – Т. 1. – С. 6–10.
6. Моисеенко В.М. Возможности вакцинотерапии меланомы кожи // Практическая онкология. – 2001. – Т. 8, № 4. – С. 58–64.
7. Манина И.В., Перетолчина Н.М., Сапрыкина Н.С. и др. Доклинические исследования иммунотерапии меланомы кожи с помощью цельноклеточных противоопухолевых вакцин, секретирующих GM-CSF // РБЖ. – 2010. – № 3. – С. 14–9.
8. Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Барышников А.Ю. и др. Клинические испытания аутологичной вакцины на основе опухолевых клеток, модифицированных геном tag-7 // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – № 1 (13). – С. 23–7.
9. 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.
10. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Чкадуа Г.З. и др. Вакцинотерапия метастатической меланомы с использованием дендритных клеток: клиническое исследование I/II фазы // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – № 2 – С. 39–43.
11. Михайлова И.Н., Иванов П.К., Петенко Н.Н. и др. Внутрикожная клеточная реакция на фоне вакцинотерапии меланомы кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 63–7.
12. Михайлова И.Н., Парсункова К.А., Евсегнеева И.В. и др. Динамика цитокинов у больных с диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии аллогенными опухолевыми клетками // РБЖ. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 13–6.
13. Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1987. – 415 с.
14. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Манько В.М., Михайлова А.А. Контроль и регуляция иммунного ответа. – Л.: Медицина. – 1981. – 311 с.
15. Суровцева М.А., Шишков А.А., Селедцова Г.В., Козлов В.А. Клинико-иммунологическая эффективность вакцинотерапии при диссеминированной меланоме кожи // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 6 (36). – С. 12–8.
16. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н. и др. Адаптивное моделирование культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // РБЖ. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 56–9.
17. Bouwhuis M.G., ten Hagen T.L., Eggermont A.M. Immunologic function as... // Mol. Oncol. – 2011. – 5. – P. 183–9.
18. Chung, M.H., Hsueh E. et al. Humoral immune response to... and sentinel lymphadenectomy // J. Clin Oncol. – 2003. – 21. – P. 313–9.

Положительная реакция IgG-антител с клетками *mel Ibr* была обнаружена только в одном из 9 образцов сыворотки крови больных меланомой, получавших вакцину «Мелавак». Было выявлено 30% антиген-положительных клеток (рис. 4).

Таким образом, при флуоресцентном иммуноцитохимическом исследовании было обнаружено появление специфических антител против меланомных антигенов в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой, получавших вакцину «Мелавак». В процессе вакцинотерапии количество антиген-положительных клеток увеличилось.

Заключение

Было проведено исследование по изучению гуморального иммунного ответа у больных с диссеминированной меланомой, получавших вакцину на основе аутологичных дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом и у больных с диссеминированной меланомой, получавших вакцину на основе аллогенных генномодифицированных опухолевых клеток – «Мелавак».

На основании полученных данных, в образцах сыворотки крови вакцинированных больных с меланомой методом непрямой РИФ не было обнаружено иммуноглобулинов, способных специфически распознавать поверхностные меланомные антигены. Однако выявлено наличие специфических противоопухолевых антител в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой при вакцинации вакциной «Мелавак» методом ФИЦХ. Окрашивание наблюдалось в цитоплазме меланомных клеток.

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

УДК 615.37:616-092.9:575.113

*А.А. Вайнсон, В.В. Мещерикова***МЕТОДИКА ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРЕПАРАТОВ Г-КСФ, ИНТЕРФЕРОНОВ α , β
И СОМАТОТРОПИНА *IN VITRO****ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация***Вайнсон Адольф Адольфович, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией лучевых методов лечения опухолей НИИ ЭДнТО***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(499)324-16-70**e-mail:** wainson@ronc.ru

Статья поступила 19.12.2011, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

Разработана простая и хорошо воспроизводимая методика оценки *in vitro* специфической активности нескольких генно-инженерных белков – филграстима (чрГ-КСФ), интерферонов α и β , и соматотропина, включающая программу автоматической статистической обработки результатов, соответствующую требованиям Европейской Фармакопеи VII. Методика основана на угнетении или стимулировании роста клеток определенных линий и используется при тестировании отечественных и импортируемых субстанций и лекарственных препаратов.

Ключевые слова: филграстим, интерфероны α и β , соматотропин, специфическая активность, тестирование на клетках *in vitro*.

*A.A. Wainson, V.V. Mescherikova***A METHOD FOR ASSESSMENT
OF FILGRASTIM (RG-CSF), α , β INTERFERONS,
AND SOMATROPIN SPECIFIC ACTIVITY IN VITRO***FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***ABSTRACT**

A simple and reproducible methods of *in vitro* assessment of several human recombinant therapeutic proteins' – filgrastim (rhG-CSF), interferons α and β , and somatropin – specific activity has been elaborated. The program of statistical processing of experimental data corresponds to XII issue of Russian Federation Pharmacopoeia. The methods are based on suppression or stimulation of specific cells growth and are used in testing the domestic and imported substances and final medical products.

Key words: filgrastim, interferons α and β , somatropin, specific activity, *in vitro* test on cell cultures.

Введение

В последние годы отечественными компаниями начат выпуск ряда генно-инженерных белков – цитокинов и гормонов, которые ранее поступали на рынок от зарубежных производителей. При этом одним из условий регистрации препарата является оценка активности белка биологическим методом, так как такой распространенный и точный метод определения количества белка в пробе, как иммуноферментный, может не заметить небольших отличий в пространственной организации молекул человеческого белка и белка, синтезированного в бактериальных клетках. Эти отличия, однако, могут уменьшать биологическую активность белка, в связи с чем производимые лекарственные препараты должны быть охарактеризованы по показателю специфической активности, которая в идеале должна быть сравнена с активностью соответствующего международного стандарта ВОЗ.

Определение активности может выполняться как *in vivo*, так и *in vitro*. При этом в первом случае специфическая активность белка тестируется на животных по выполнению белком той же функции, ради которой его, собственно говоря, и производят. В системах *in vitro* оценка специфической активности полученного белка может производиться по

критериям, не имеющим ничего общего с его функцией в организме, но которые, тем не менее, позволяют адекватно оценивать действие данного белка на человека (примером является оценка активности гормона соматотропина по стимулированию роста клеток Nb-2 лимфомы крыс *in vitro*).

Предмет данного сообщения – рассмотрение собственного опыта оценки специфической активности, включая статистическую обработку результатов тестирования, четырех генно-инженерных белков: трех цитокинов – гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и интерферонов альфа и бета, и одного гормона – соматотропина. Все эти белки как лекарственные препараты являются дженериками, так что тот или иной вариант определения их специфической активности уже имеется у зарубежных компаний-производителей, но особенности использования этих методов в доступных публикациях отсутствуют. Кроме того, выяснилось, что имеющиеся в открытых источниках описания методов оценки биологической активности некоторых генно-инженерных белков не удается воспроизвести при простом копировании; возможно, в статьях были опущены какие-то существенные подробности.

Методики основаны на одном принципе – на стимулировании или угнетении роста определенно-

го вида клеток в культуре. Эффект стимулирования или угнетения роста оценивается с помощью варианта хорошо известного МТТ-теста и сравнивается с эффектом действия соответствующего международного стандарта, а также, для дополнительного контроля, с препаратами ведущих мировых производителей.

Материалы и методы

Определение активности филграстимов

В литературе имеется несколько публикаций с описанием методики оценки активности чГ-КСФ. Исходно мы попытались использовать методики, основанные на работе с коммерческими линиями клеток. Согласно сообщению Yamaguchi T. et al., чГ-КСФ в концентрации 0,3–10 нг/мл усиливает пролиферацию промиелоцитарных клеток линии HL-60 человека, которая была предварительно подавлена введением в среду ДМСО или ретиноидной кислоты, и степень увеличения скорости роста авторы предложили использовать при оценке рчГ-КСФ [15]. В наших экспериментах, однако, наблюдалось значительное варьирование от опыта к опыту диапазона «действующих» концентраций рчГ-КСФ, возможно, связанное со сложностью такой методики оценки, когда необходимо применение агентов и для подавления, и для стимулирования роста клеток. Также не дала результатов попытка работать с клетками линии 32D, полученными из костного мозга мышей [13], хотя к началу наших исследований имелась информация об их использовании для оценки активности производителями рчГ-КСФ (насколько нам известно, сейчас эти клетки для такой цели не используются).

Вместе с тем, в литературе имелись данные о чувствительности к чГ-КСФ линии NFS-60 клеток миелоидного лейкоза мышей [5; 6; 9–11], которая, однако, до сих пор не представлена ни в одной из коммерческих коллекций. По нашему запросу клетки этой линии [14] были любезно присланы одним из ее создателей, профессором Джеймсом Иле из St Jude Children's Research Hospital в Мемфисе, США. Появившиеся в последнее время технические и методические усовершенствования позволили разработать простую в исполнении и обладающую очень высокой точностью методику определения активности рчГ-КСФ (филграстима), описываемую ниже.

Тестирование проводится в плоскодонных 96-луночных планшетах, в которых клетки NFS-60 инкубируют с филграстимом в разных концентрациях в течение 2 сут. Различия в количестве выросших клеток выявляют с помощью их дальнейшей инкубации в присутствии красителя, меняющего цвет при метаболизировании клетками. Изменение цвета красителя оценивают либо по поглощению, либо по флуоресценции исходного и конечного продукта.

В наших условиях клетки выращивали на среде RPMI-1640 (ПанЭко, Москва) с добавлением 10 % сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (HyClone, США). Для роста этих клеток необходим мышинный интерлейкин-3, который приобретали у фирмы BD Biosciences (США), а затем стали использовать среду, в которой выращивали клетки WENI (линия В-клеточной лимфомы мышей), выделяющие интерлейкин-3 как продукт метаболизма. Филграстим также обладает стимулирующим действием и может быть использован для замены интерлейкина-3. Поэтому перед проведением теста клетки, которые растут в суспензионной культуре, должны быть отмыты от этих стимуляторов роста с повторным центрифугированием.

Как агент, изменение окраски которого слу-

жит индикатором количества выросших клеток, использовали АламарБлю (Invitrogen, США), меняющий при метаболизме цвет с голубого на розовый. Изменение цвета хорошо видно на глаз, а так как краситель для клеток нетоксичен, периодически осматривая планшеты можно выбрать время, когда следует произвести измерение экстинкции (это относится и к флуоресценции), а именно момент, когда лунки с нерастущими клетками остались синими, а лунки с наибольшим ростом клеток стали ярко розовыми (рис. 1; см. вклейку). Это дает возможность «прописать» полную S-образную кривую «концентрация препарата – эффект конверсии красителя» (концентрация препарата указывается на оси абсцисс в логарифмическом масштабе).

Эффект стимулирования роста клеток NFS-60 тем более заметен, чем длительнее их экспозиция с чГ-КСФ. Мы остановились на 48 ч длительности роста клеток до введения красителя: при длительности клеточного цикла около 12 ч за это время количество посеянных клеток увеличивается в 16 раз. Отметим, что при проведении как этого, так и описываемых далее тестов рационально вносить в лунку от 10 до 15 тыс. клеток, чтобы к концу роста они покрывали не более 70% площади дна. Для воспроизводимости условий постановки эксперимента от опыта к опыту целесообразно производить посев одного и того же количества клеток с точностью $\pm 5\%$, для чего, в соответствии с распределением Пуассона, в камере Горяева надо просчитывать 400 клеток, независимо от числа «квадратов», в которых они находятся.

В описываемых экспериментах при работе планшеты располагали вертикально и «на точку» использовали по шесть лунок. В одном планшете проводили оценку двух образцов, используя 8 концентраций препаратов, отличающихся друг от друга, например, в два раза. Вначале во все лунки 2–8-й колонок вертикально расположенных планшетов 12-канальной электронной пипеткой (Biohit, Финляндия) вносили по 100 мкл питательной среды, затем в шесть лунок первой и второй колонок вносили по 100 мкл разведенного в среде одного из стандартов – либо «Международного стандарта» ВОЗ [7], либо отечественного «Стандартного образца», а в шесть других лунок этих колонок – испытуемого препарата. Образцы и «Стандарты», и препаратов вносили в 2–3 повторностях на параллельные планшеты. После перемешивания образцов и среды в лунках второй колонки оттуда переносили по 100 мкл разведенного препарата в лунки третьей колонки, и т.д. до восьмой колонки, из которой после перемешивания удаляли по 100 мкл. Далее во все лунки планшетов вносили по 100 мкл суспензии клеток и планшеты ставили в инкубатор на 48–55 ч. Затем в лунки вносили по 20 мкл красителя, и через 9–14 ч оценивали степень его конверсии, измеряя либо экстинкцию на аппарате иммуноферментного анализа Униплан (ПИКОН, Москва), либо флуоресценцию на аппарате Plate Chameleon V 425-106 Multilabel Counter, Hidex Oy (Финляндия). Для красителя АламарБлю из-за значительного перекрытия спектра поглощения исходного красителя и его метаболизированного продукта экстинкцию измеряют при двух длинах волн, – в нашем случае использовали фильтры λ 535 и 590 нм с дальнейшим проведением расчета согласно прилагаемой к красителю инструкции, а при измерении флуоресценции для возбуждения использовали излучение с λ 544 нм, а само измерение проводили при 590 нм.

Заметим, что вместо дорогого АламарБлю возможно использование его основного компонента – более дешевого ресазурина (Sigma, США). Вме-

сто АламарБлю и ресазурина можно использовать и более распространенный краситель МТТ, однако при метаболическом восстановлении формазан образует кристаллы, нерастворимые в водной среде.

Для их растворения прямо в питательной среде, не осажая растущие в виде суспензии клетки, в неё добавляют на несколько часов подкисленный изопропиловый спирт с Triton X-100 или другой растворитель, например, 10%-ный додецилсульфат натрия. Степень роста числа клеток определяют спектрофотометрически по увеличению оптической плотности при λ , например, 530 нм.

Кривые доза–эффект для одного из проведенных тестов, в котором сравнивали активность выпускаемого компанией Фармстандарт-УфаВита филграстима «Нейпомакс», Международного стандарта филграстима ВОЗ [Granulocyte colony stimulating factor (human, rDNA-derived, First international standard, выпускается NIBS (Великобритания) Code 88/502, Version 4, January 2006] и отечественного «Стандартного образца» филграстима приведены на рис. 2. Конечная концентрация филграстима в лунках первой колонки планшетов, с учетом разведения после добавления суспензии клеток, равна 0,05 нг/мл (5 МЕ, активность 1 нг филграстима соответствует 100 МЕ), а в лунках последней, 8-й колонки – 0,39 пг/мл (0,039 МЕ); концентрация чГ-КСФ, обеспечивающая максимальную скорость роста, в разных опытах составила 1–3 МЕ/мл среды. Концентрация, при которой происходит 50%-ное усиление роста клеток, составляет $\approx 0,5$ МЕ/мл, т.е. 0,005 нг/мл.

Заметим, что, согласно данным литературы, у других авторов, проводивших тестирование филграстима, даже на клетках NFS-60, эта величина лежала в диапазоне существенно больших концентраций препарата: от 0,1–0,15 нг/мл [5; 9; 10] и до 2 нг/мл [15]. Гораздо более высокая чувствительность используемой нами методики оказалась очень полезной и при определении активности чГ-КСФ в биологических жидкостях.

Полученные данные анализируют методом определения эквивалентных доз (Государственная фармакопея РФ XII, часть 2) [2]. На всех кривых «доза–эффект» можно выделить относительно линейные участки, на которых располагаются «точки» – данные о конверсии красителя – для трех концентраций «Международного стандарта» и препаратов. Анализ результатов с целью определения специфической активности изучаемого препарата относительно «Стандарта» проводили по программе, разработанной в редакторе Excel (рис. 3). Описанный метод использован при подготовке к выпуску отечественного филграстима «Нейпомакс» [3], хорошо зарекомендовавшего себя при лечении онкологических больных [1], а также при проверке ряда других субстанций и лекарственных препаратов – филграстимов отечественного производства.

Определение активности интерферонов α и β

Специфическую активность генно-инженерных интерферонов α и β , используемых при лечении онкологических заболеваний и помощи больным рассеянным склерозом, проверяли по угнетению роста клеток линии Daudi лимфомы Беркита человека. Клетки были приобретены в Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН. Сравнение проводили со стандартами ВОЗ (WHO International Standard INTERFERON ALPHA 2b, (Human rDNA derived) NIBSC code: 95/566, Potency is 70000 IU/ 500ng и Interferon beta SER17 Mutein, Human, rDNA derived, NIBSC code 00/574, Potency is 64,000 IU/1125 ng). Период удвоения клеток Daudi состав-

ляет сутки, так что инкубацию клеток с препаратом приходится проводить в течение более длительного времени, чем при работе с мышиными клетками, а именно в течение 72–120 ч.

Методика тестирования и статистическая обработка данных аналогичны описанной для филграстима. Принципиальной разницы в проведении тестирований интерферона α и β не было. На рис. 4 и 5 приводятся результаты экспериментов по сравнению активности опытных образцов этих интерферонов с активностью стандартов ВОЗ.

Определение активности соматотропина

Специфическую активность генно-инженерных препаратов гормона роста человека оценивали по ускорению роста клеток линии Nb-2 лимфомы крыс. Клетки получены в дар от проф. A.R. Buckley, University of Cincinnati Medical Center, США. Исходно культуру клеток из узла лимфомы крыс линии Nb получил проф. P. Gout [4; 8], ныне работающий в Department of Cancer Endocrinology, BC Cancer Agency, Канада, который и организовал передачу клеток Nb-2 для выполнения данной работы как одного из наиболее подходящего для этой цели объекта [12].

Клетки выращивали на среде RPMI-1640 с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 10% лошадиной сыворотки, а также 60–100 мкМ 2-меркаптоэтанола. В самом тесте активности соматотропина используется среда, не содержащая ни фетальной, ни лошадиной сыворотки. Вместо них используется 10% сыворотки мерина, которая не содержит лактогенных гормонов, также стимулирующих рост клеток Nb-2. Поэтому перед постановкой теста клетки отмывают от «ростовой» среды центрифугированием.

Сравнение проводили со стандартами ВОЗ (WHO International Standard Somatropin – Recombinant DNA-Derived Human Growth Hormone; 3.0 IU/mg somatropin; NIBSC code: в начале нашей работы – стандарт 88/624, затем – стандарт 98/574).

Методика постановки тестов была такой же, как и в экспериментах с филграстимом. Кривые зависимости усиления конверсии АламарБлю от дозы препаратов, построенные по данным, полученным при измерении экстинкции, представлены на рис. 6, а полученные при измерении флуоресценции – на рис. 7.

Видно, что 50%-ное ускорение роста достигается в первом случае при концентрации соматотропина в 0,04 нг/мл среды, а при использовании более чувствительного метода оценки – по флуоресценции – при 0,02 нг/мл. Разработанная методика используется для проверки специфической активности различных препаратов соматотропина, в первую очередь отечественного генно-инженерного соматотропина человека «РАСТАН».

Заключение

Разработаны методики оценки специфической активности нескольких генно-инженерных рекомбинантных белков медицинского назначения и программа статистической обработки экспериментальных данных, соответствующая требованиям Государственной фармакопеи РФ XII.

Эти методики постоянно используются при оценке дженериков, выпускаемых отечественными фармацевтическими компаниями, а также субстанций и лекарственных препаратов, ввозимых из-за рубежа.

Литература

1. Абрамов М.Е., Жукова Л. Г., Личиницер М.Р. Клиническая эффективность и безопасность применения отечественного рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора Нейпомакс у больных раком молочной железы, получающих химиотерапию Доксорубицином и Доцетакселем // Современная онкология. – 2009. – 11(3) – С. 46-50.
2. Государственная Фармакопея РФ XII, часть 2. М. Научный центр экспертизы средств медицинского применения, – 2012.
3. Кононова Н.В., Бобрускин А.И., Костромина Т.И., Мелихова Т. Д. и др. Разработка и оптимизация технологического процесса получения субстанции филграстима // Биотехнология. – 2009. – № 5. – С. 24–32.
4. Gout P.W., Beer C.T., Noble R.L. Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas // Cancer Res. – 1980. – 40(7). – P. 2433–6.
5. Hammerling U., Kroon R. Sjödin L. In vitro bioassay with enhanced sensitivity for human granulocyte colony-stimulating factor // J Pharm Biomed Anal. – 1995. – 13(1). – P. 9–20.
6. Matsuda S., Shirafuji N., Asano S. Human granulocyte colony-stimulating factor specifically binds to murine myeloblastic NFS-60 cells and activates their guanosine triphosphate binding proteins/adenylylate cyclase system // Blood. – 1989. – 74(7). – P. 2343–8.
7. Mire-Sluis A.R., Das R.G., Thorpe R. The international standard for granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). Evaluation in the international collaborative study // J Immunol Methods. – 1995. – 179(1) – P. 117–126.
8. Noble R.L., Beer C.T., Gout P.W. Evidence in vivo and in vitro of a role for the pituitary in the growth of malignant lymphomas in Nb rats // Cancer Res. – 1980. – 40(7). – P. 2437–40.
9. Saito K., Yamamoto K., Atsumi M. et al. Bioassay of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. Evaluation of the measurements of biological activity and correlations among in vitro colony-forming, NFS-60, AML-193, and in vivo CPA-mouse methods// Basic Pharmacology Therapeutics. – 1990. – 18(Suppl. 9) – P.S2201-S2211 (на японском).
10. Shimane M., Shimada H., Motpjima H. et al. Sensitive assay in vitro of biological activity for recombinant human G-CSF (r G-CSF) using NFS-60 cells// Basic Pharmacology Therapeutics. – 1990. – 18(Suppl. 9) – P.S-2193-S-2199 (на японском).
11. Shirafuji N., Asano S., Matsuda S. et al A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders // Exp Hematol. – 1989. – 17(2). – P. 116–9.
12. Tanaka T., Shiu R.P., Gout P.W. et al. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum // Clin Endocrinol Metab. – 1980. – 51(5). – P.1058–63.
13. Valtieri M., Tweardy D.J., Caracciolo D. et al. Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line // J Immunol. – 1987. – 138(11). – P. 3829–35.
14. Weinstein Y., Ihle J.N., Lavu S., Reddy E.P. Truncation of the c-myb gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1986. – 83(14). – P. 5010–4.
15. Yamaguchi T., Yamaguchi T., Kogi M. et al. Bioassay of human granulocyte colony-stimulating factor using human promyelocytic HL-60 cells // Biol Pharm Bull. – 1997. – 20(9). – P. 943–7.

УДК 615.014.2:615.357:616-092.9

Н.И. Зимакова¹, Е.Ю. Колесникова¹, А.П. Будько¹, З.Г. Дейчман¹, А.Е. Золотарев¹, Г.А. Бадун², М.Г. Чернышева²
**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ
АНАЛОГА ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ГОРМОНА СОМАТОСТАТИНА (АГГ)**

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва²МГУ им. М.В. Ломоносова**Контактная информация**

Зимакова Наталья Ивановна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией фармакокинетики НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-22-34

e-mail: zimakovan@mail.ru

Статья поступила 11.07.2012, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

В рамках доклинического изучения фармакокинетики лекарственной формы аналога гипоталамического гормона соматостатина (АГГ) был разработан метод получения ³Н-АГГ синтетическим путем из ³Н-тетрапептида, полученного методом бомбардировки молекул вещества термически активным газообразным тритием, и цистеина. Фармакокинетические исследования АГГ в 15 тканях и органах мышей при пероральном введении в лекарственной форме показали хорошую доступность препарата ко всем органам и тканям, включая Са755, и высокую тропность к желудку и костному мозгу. Изучение выведения препарата из организма животных с мочой и калом показало, что кумулятивная экскреция составляет 16 и 78 % соответственно и в основном заканчивается к 24 ч наблюдения.

Ключевые слова: доклиническая фармакокинетика, аналог гипоталамического гормона соматостатина.

N.I. Zimakova¹, E.Y. Kolesnikova¹, A.P. Budko¹, Z.G. Deychman¹, A.E. Zolotarev¹, G.A. Badun², M.G. Chernysheva²
**PRECLINICAL STUDY PHARMACOKINETICS DRUG FORM
OF ANALOG HYPOTHALAMIC HORMONE SOMATOSTATINE (AGG)**

¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow**Abstract**

As part of pre-clinical pharmacokinetic study of the dosage form of the hypothalamic hormone somatostatin analogue has been developed a method for ³H-AGG by synthesis of ³H-tetrapeptide obtained by the bombardment of molecules thermally active substances with gaseous tritium, and cysteine. Pharmacokinetic studies AGG in 15 tissues and organs of mice when administered in the dosage form of the drug showed good accessibility to all organs and tissues, including Sa755, and a high affinity to the stomach and bone marrow. Withdrawal from the study of the animal organism in the urine and feces showed that the cumulative excretion of respectively 16 % and 78 %, and mostly ends in 24h surveillance.

Key words: pre-clinical pharmacokinetics, an analog of the hypothalamic hormone somatostatin.

Введение

Аналог гипоталамического гормона соматостатина был синтезирован в лаборатории химического синтеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Синтез пентапептида осуществляли постепенным наращиванием пептидной цепи, завершая стадией присоединения молекулы аминокислоты цистеина, предварительно защищенной по функциональным группам [1]. Была показана более высокая противоопухолевая активность синтезированного аналога соматостатина на ДМБА-индуцированных опухолях молочной железы и на РМ-1, перевиваемом раке молочной железы человека, у бестимусных мышей в сравнении с применяемым в клинической практике сандостатином [1]. По результатам изучения противоопухолевой активности препарат был рекомендован для широких доклинических исследований, в рамках которых проводилось изучение его фармакокинетики [2].

Целью работы было доклиническое изучение фармакокинетики АГГ в таблетированной лекарственной форме у мышей с перевитой внутримышечно аденокарциномой молочной железы мышей (Са755).

Задачи работы:

1. Получение ³Н-АГГ методом термической активации газообразного трития.
2. Изучение кинетики распределения и элиминации ³Н-АГГ в крови, органах и тканях мышей после однократного перорального введения препарата в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг.
3. Изучение кинетики экскреции ³Н-АГГ и его метаболитов из организма животных с мочой и калом после однократного перорального введения.

Материалы и методы

В исследовании использовали меченый тритием препарат, полученный с помощью метода термической активации газообразного трития [3; 4]. На первом этапе разработки метода получения ³Н-АГГ было показано, что радиохимический выход меченого АГГ оказался низким, а отделение целевого продукта от реактивных примесей затруднено из-за того, что при обработке вещества потоком атомов трития происходило отщепление защитных групп и раз-

рыв связи C-S в остатке цистеина. Для увеличения радиохимического выхода меченого продукта на втором этапе разработки тритиевую метку вводили в тетрапептид, а затем проводили стадию химического синтеза ^3H -тетрапептида с цистеином. Для очистки меченого препарата использовали пластинки ТСХ Silufol UV-254 и жидкостный хроматограф HP 1050, Hewlett-Packard, США.

Для контроля степени радиохимической чистоты ^3H -АГГ и уточнения его удельной радиоактивности была применена разработанная нами методика ВЭЖХ. Колонка YMC SiO₂, 150×3 мм, 5 мкм. Подвижная фаза – 30 : 1,2 : 6 (по объему) гептан : метанол:хлороформ. Скорость подачи 0,4 мл/мин. Температура комнатная. Детектирование при 290 нм. Для количественного определения ^3H -АГГ использовали площадь пика стандартного раствора препарата с известной концентрацией (метод внешней калибровки). Результат измерения количества ^3H -АГГ: 6,76 мкг/850 мКи. На рис. 1 представлена хроматограмма ^3H -АГГ и график распределения радиоактивности в собранных в процессе ВЭЖХ фракциях. Радиохимическая чистота полученного ^3H -АГГ составляла 90 %. Для биологических экспериментов ^3H -АГГ растворяли в микроколичестве ДМСО и в соответствующих аликвотах добавляли в лекарственную форму препарата, подготовленную для введения животным, после чего суспензию тщательно перемешивали.

В эксперименте использовали мышей СВА, самок, весом 21 г с перевитой внутримышечно Ca755, на 7-й день после перевивки. Животных группировали по 6 особей на каждую временную точку. Забор образцов органов и тканей проводили отдельно у каждой особи через 0,25; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 24,0; 48,0 и 96,0 ч после введения препарата. Препарат вводили с помощью желудочного зонда в виде суспензии гранулята таблетированной лекарственной формы в 1 % крахмальном геле в объеме 0,2 мл в дозе 0,21 мг (16 мКи)/мышь, что составляет 10 мг (0,762 мКи)/кг. Концентрацию ^3H -АГГ определяли в 15 объектах: в крови, плазме, легких, печени, почках, селезенке, головном мозге, опухоли Ca755, костном мозге, поджелудочной железе, стенке желудка, стенке кишечника, надпочечниках, лимфатических узлах, тимусе.

Для изучения экскреции ^3H -АГГ с мочой и калом группу животных в количестве 5 особей помещали в метаболическую клетку «Tecniplast», Италия. Мочу и кал мышей собирали отдельно в периоды 0–5 ч, 5–24 ч, 24–48 ч, 48–72 ч и затем обрабатывали.

Навески органов и тканей делали из полученных гомогенатов на весах «Sartorius laboratory L 420 S» в количестве 100±1 мг и подвергали щелочному гидролизу в 3М растворе КОН в объеме, равном 1 мл, при температуре 90 °С в течение 40 мин. Точные аликвоты в объеме 50 мкл вносили во флаконы, содержащие 15 мл сцинтилляционной жидкости «Ultimo-Gold», Perkin Elmer США (из каждого гидролизата в 3 флакона). До получения гомогенатов образцы желудка и кишечника освобождали от содержимого и тщательно отмывали внутренние поверхности от сорбированных остатков. Образцы бедренной кости вместе с костным мозгом взвешивали и подвергали щелочному гидролизу, принимая весовое содержание костного мозга, равным 4 % от общего веса. Плазму крови стандартно получали из гепаринизированной крови центрифугированием. Кровь и плазму в количестве 100 мкл отбирали пипетками Brandt с постоянным объемом и добавляли

к 1 мл 3М раствора КОН. Образцы подвергали гидролизу в вышеуказанных условиях, затем из каждого гидролизата отбирали материал параллельно в 3 флакона. Таким образом, значение показателя радиоактивности для каждой пробы рассчитывали как среднее значение из 3 измерений.

Кал взвешивали и подвергали щелочному гидролизу при температуре 90 °С с последующим измерением содержания радиоактивности в аликвотах гидролизата. Измеряли объем мочи и концентрацию радиоактивности в аликвотах, помещенных во флаконы со сцинтилляционной жидкостью.

Флаконы с содержащейся в них радиоактивностью обсчитывали на счетчике 1219 Rack beta (spectral) LKB Wallac. Расчет концентраций препарата в крови или ткани:

$$\frac{A \times 1000}{50} \div 2,2 \times 10^6 \times K \times 10, \text{ где}$$

С – концентрация мкг/мл крови или мкг/г ткани;

А – (dpm) – значение счета радиоактивности;

1000 – мкл – объем пробы (гидролизата 100 мг ткани или 100 мкл крови);

50 – мкл – объем пробы (гидролизата), помещенный в флакон для счета радиоактивности;

$2,2 \cdot 10^6$ – dpm – значение счета (количество распадов в минуту, соответствующее 1 мКи);

К – соотношение доза/радиоактивность (мкг/мКи на животное);

10 – коэффициент перехода к 1 мл крови или грамму ткани.

Величины концентраций АГГ в органах и тканях рассчитывали как средние из 6 параллельных значений концентрации препарата в каждом образце материала от 6 животных, условно относя всю имеющуюся радиоактивную метку к молекуле исходного продукта. Величину радиоактивности каждого образца получали как среднее значение из 3 параллельных измерений.

Результаты

В табл. 1 представлены результаты измерения концентрации ^3H -АГГ в органах и тканях мышей для каждой временной точки, выбранной для отбора образцов. Для сравнительной оценки концентраций ^3H -АГГ в органах и тканях были рассчитаны их соотношения к концентрации препарата в крови (табл. 2).

В табл. 3 представлены расчетные фармакокинетические параметры: площади под АUC, построенными по результатам измерения концентраций препарата в интервале времени 15 мин – 96 ч; соотношение площадей для органа и крови, показывающие величину тропности препарата к объекту исследования, и средние времена его удержания (MRT) органа и тканями животных.

Кинетические кривые на рис. 2–7, описывающие изменения концентрации ^3H -АГГ в крови, плазме и органах животных, и построенные по данным, представленным в табл. 1, были характерными для перорального введения: с первой фазой всасывания, когда происходит повышение уровней концентрации препарата, затем фазами распределения и выведения. ^3H -АГГ сравнительно быстро всасывался и поступал в органы и ткани животных: максимальные значения концентраций препарата измеряли в основном через 0,5ч после введения препарата.

Таблица 1

Средние значения концентрации ^3H -АГГ в органах и тканях мышей после однократного перорального введения в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг

Орган, ткань	[C]*, мкг/г ткани							
	время, ч							
	0,25	0,5	1,0	3,0	5,0	24,0	48,0	96,0
кровь**	0.50±0.08	0.76±0.10	0.68±0.11	0.48±0.05	0.63±0.05	0.59±0.06	0.51±0.03	0.29±0.03
плазма**	0.75±0.11	1.06±0.12	0.95±0.33	0.62±0.08	0.74±0.07	0.70±0.04	0.55±0.04	0.30±0.03
легкие	1.38±0.04	0.97±0.06	0.92±0.08	0.83±0.19	0.63±0.20	0.58±0.08	0.47±0.07	0.18±0.03
печень	0.60±0.10	1.54±0.08	1.23±0.19	0.94±0.13	0.81±0.10	0.65±0.07	0.58±0.07	0.33±0.08
почки	1.21±0.15	1.81±0.16	1.53±0.50	0.82±0.19	0.76±0.08	0.62±0.03	0.51±0.04	0.28±0.06
селезенка	0.44±0.08	0.74±0.12	0.59±0.08	0.51±0.06	0.59±0.09	0.58±0.07	0.50±0.04	0.28±0.06
головной мозг	0.21±0.02	0.45±0.04	0.48±0.10	0.40±0.07	0.43±0.03	0.51±0.04	0.40±0.04	0.23±0.06
опухоль Ca ₇₅₅	0.26±0.05	0.66±0.04	0.58±0.04	0.39±0.06	0.49±0.04	0.56±0.08	0.45±0.05	0.27±0.05
костный мозг	13.45±3.18	10.69±1.79	13.67±2.59	8.73±2.20	8.16±0.65	7.99±0.81	10.53±2.6	7.57±1.50
подж. железа	0.48±0.03	1.00±0.12	1.08±0.20	0.64±0.10	0.70±0.10	0.56±0.01	0.48±0.02	0.28±0.04
желудок	79.49±11.2	52.17±13.0	50.95±8.3	50.95±1.9	25.24±1.86	0.76±0.2	0.59±0.15	0.18±0.05
кишечник	3.81±1.87	15.78±1.33	6.71±1.29	1.75±0.49	1.80±0.59	0.36±0.05	0.31±0.05	0.08±0.02
надпочечники	0.36	0.83	0.61	0.35	0.38	0.26	0.23	0.17
лимф. узлы	0.23	0.49	0.52	0.33	0.40	0.39	0.40	0.19
тимус	0.26	0.61	0.45	0.40	0.47	0.49	0.48	0.19

В надпочечниках, лимфатических узлах, тимусе не показан доверительный интервал, так как количественное определение проводили по одному объединенному образцу.

*± величина доверительного интервала; ** мкг/мл.

Таблица 2

Соотношение концентраций ^3H -АГГ в органах и тканях мышей к крови после однократного перорального введения в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг

Орган, ткань	[C] орган/ [C] кровь							
	время, ч							
	0,25	0,5	1,0	3,0	5,0	24,0	48,0	96,0
кровь	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
плазма	1,50	1,39	1,39	1,29	1,17	1,18	1,08	1,03
легкие	2,76	1,27	1,35	1,73	1,00	0,98	0,92	0,62
печень	1,20	2,02	1,81	1,96	1,28	1,10	1,14	1,14
почки	2,42	2,38	2,25	1,71	1,21	1,05	1,0	0,96
селезенка	0,88	0,97	0,87	1,06	0,94	0,98	0,98	0,96
головной мозг	0,42	0,59	0,70	0,83	0,68	0,86	0,78	0,79
опухоль Ca ₇₅₅	0,52	0,87	0,85	0,81	0,78	0,95	0,51	0,93
костный мозг	26,9	14,06	20,10	18,19	12,95	13,54	20,65	26,10
поджелудочная железа	0,96	1,31	1,59	1,33	1,11	0,95	0,94	0,96
желудок	158,98	68,64	74,85	106,14	40,06	1,29	1,16	0,62
кишечник	7,62	20,76	9,87	3,65	2,86	0,61	0,61	0,27
надпочечники	0,72	1,10	0,89	0,73	0,60	0,44	0,45	0,58
лимфатические узлы	0,46	0,64	0,76	0,69	0,63	0,66	0,78	0,65
тимус	0,52	0,80	0,66	0,83	0,75	0,83	0,94	0,65

Таблица 3

Фармакокинетические параметры ^3H -АГГ для крови и органов мышей после однократного перорального введения в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг

Орган, ткань	Фармакокинетические параметры		
	AUC, мкг·ч/г	AUC орган/AUC кровь	MRT, ч
кровь	46,97	1,0	40,48
плазма	52,62	1,12	38,90
легкие	43,71	0,93	35,67
печень	55,38	1,18	38,78
почки	50,72	1,08	37,33
селезенка	45,42	0,97	40,45
головной мозг	36,92	0,78	40,82
опухоль Ca ₇₅₅	41,83	0,89	41,31
костный мозг	858,68	18,28	46,90
поджелудочная железа	46,64	0,99	35,79
желудок	501,73	10,68	7,01
кишечник	57,93	1,23	17,65
надпочечники	23,76	0,50	39,83
лимфатические узлы	33,07	0,70	40,94
тимус	38,93	0,83	39,75

AUC – площадь под фармакокинетической кривой; MRT – среднее время удержания

Таблица 4

Экскреция ^3H -соединений с мочой и калом мышей при однократном пероральном введении ^3H -АГТ в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг

Время отбора экскрементов, ч	Среднее значение кумулятивной экскреции в % от введенной дозы		
	Моча	кал	сумма
5,0	3,16	30,90	34,06
24,0	12,91	72,25	85,16
48,0	15,59	77,4	92,99
72ч	16,05	78,05	94,1
Соотношение кал/моча	—	4,86	—

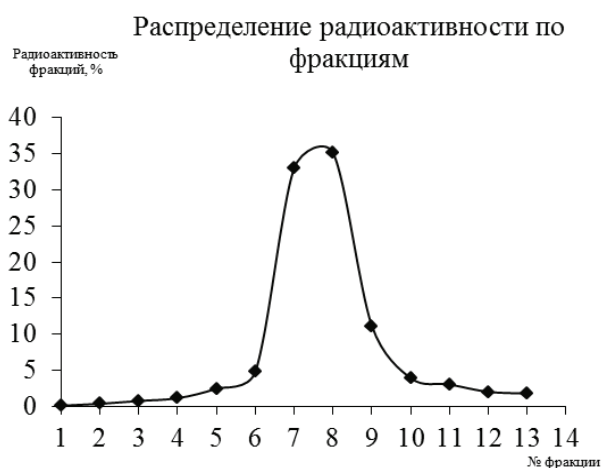
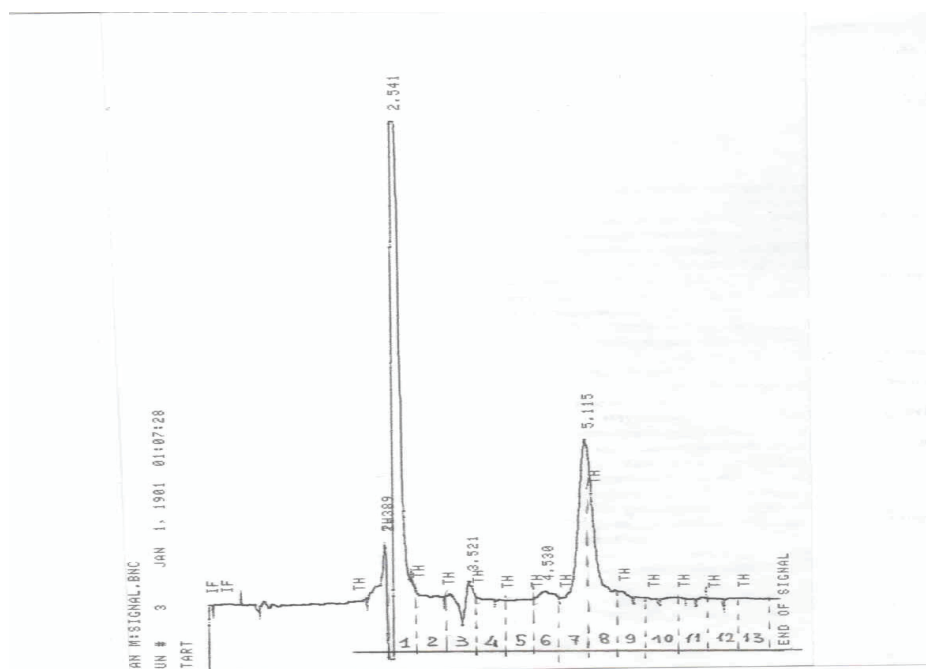


Рис. 1. Хроматографический анализ ^3H -АГТ и график распределения радиоактивности по соответствующим фракциям.

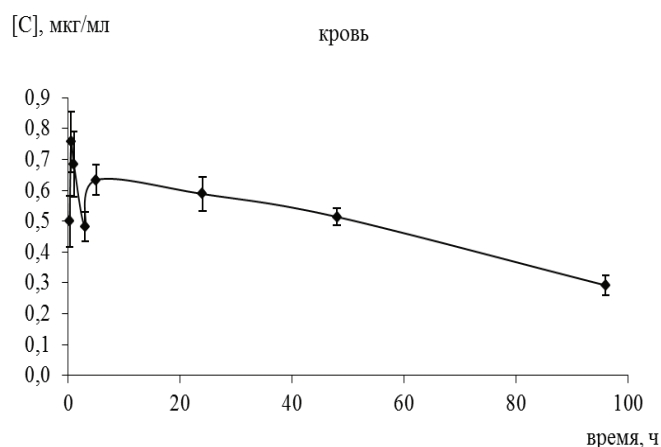


Рис. 2. Фармакокинетическая кривая ^3H -АГТ для крови мышей при однократном пероральном введении препарата в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг

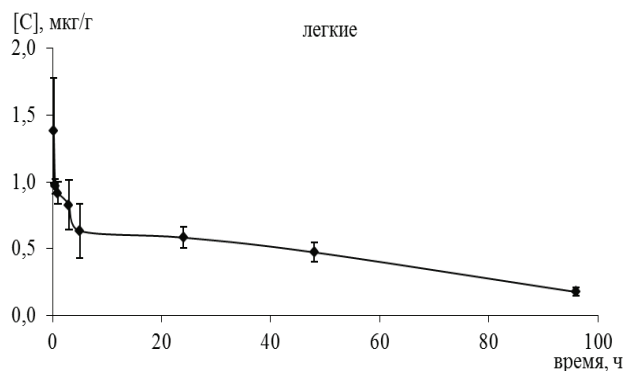


Рис. 3. Фармакокинетическая кривая ^3H -АГГ для легких мышей при однократном пероральном введении препарата в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг.

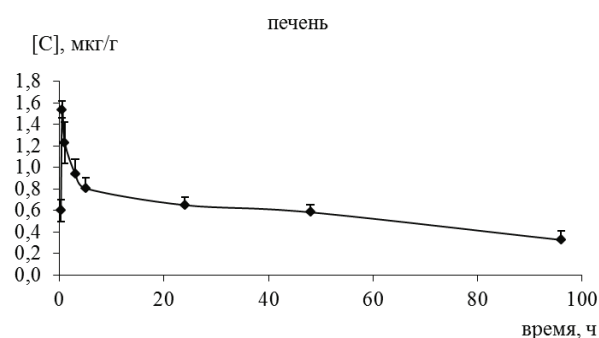


Рис. 4. Фармакокинетическая кривая ^3H -АГГ для печени мышей при однократном пероральном введении препарата в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг.

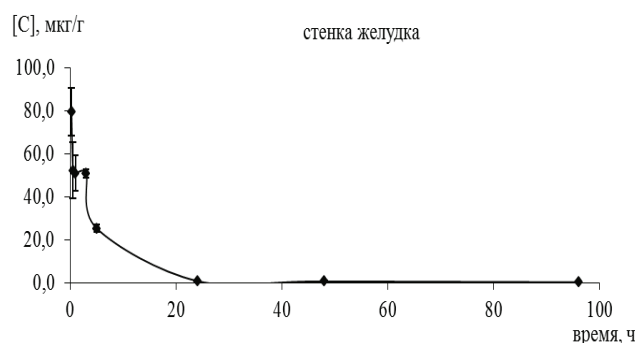


Рис. 5. Фармакокинетическая кривая ^3H -АГГ для стенки желудка мышей при однократном пероральном введении препарата в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг.

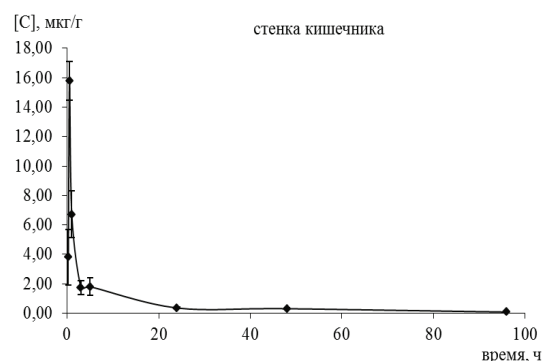


Рис. 6. Фармакокинетическая кривая ^3H -АГГ для стенки кишечника мышей при однократном пероральном введении препарата в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг.

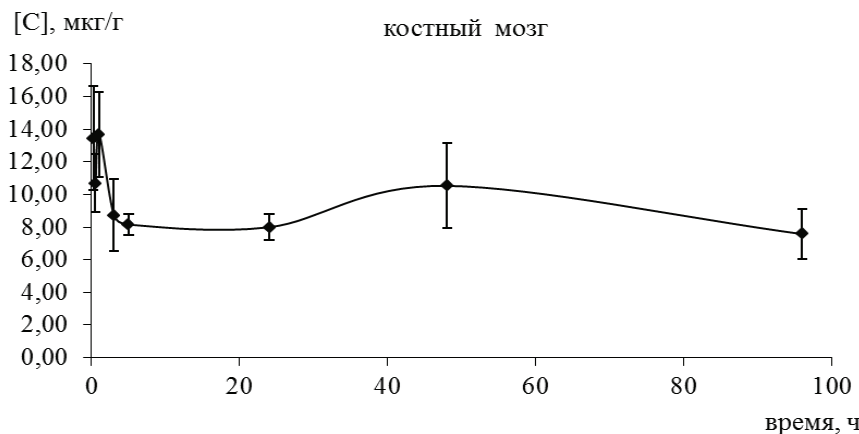


Рис. 7. Фармакокинетическая кривая ^3H -АГГ для костного мозга мышей при однократном пероральном введении препарата в дозе 10 мг (0,762 мКи)/кг

Исключение составили легкие, костный мозг и стенка желудка, где фаза нарастания концентрации ^3H -соединений была короче и приходилась на период 0–15 мин. После достижения максимальных концентраций наблюдалось медленное снижение концентрации препарата практически во всех органах и тканях, кроме стенок желудка и кишечника. В желудке и кишечнике происходило быстрое снижение содержания радиоактивных продуктов, практически на порядок к 24 ч наблюдения, при этом к 5 ч в стенке желудка оставалось 31,7 % от максимального уровня, а в стенке кишечника уже к 3 ч определяли только 11,0 % от максимальной 30 мин концентрации.

Необычно высокие концентрации ^3H -АГГ отмечены в легких в начальный момент наблюдения (15 мин) – 1,38 мкг/г, что более, чем в 2 раза больше, чем в печени, крови или плазме. Затем, только к 5 часам, концентрация ^3H -соединения снижалась до уровня крови – 0,63 мкг/мл. В поджелудочной железе концентрация препарата достигала максимальной величины к 1 ч и превышала таковую для крови в 1,6 раза; затем снижалась до уровня крови только к 24 ч после введения препарата. В опухоли Ca755 максимальные концентрации отмечались к 0,5 ч – 0,66 мкг/г, далее происходило их медленное уменьшение к 48 ч на 30–35 %.

В желудке (стенке без содержимого) концентрация препарата через 15 мин после введения составила 79,5 мкг/г и за 5 часов снизилась в 3 раза, что отражает как процессы всасывания, так и накопления препарата в исследуемой ткани. Так, в период наблюдения с 0,5 до 3 ч концентрация ^3H -АГГ практически не изменялась, что, видимо, является следствием связывания препарата с рецепторами, содержащимися в стенке желудка. В стенке кишечника происходит подъем концентрации с 3,8 мкг/г к 0,25 ч до 15,78 мкг/г через 0,5 ч, что отражает поступление препарата из желудка; далее к 3 ч наблюдения концентрация ^3H -соединения уменьшается в 9 раз от 15,7 до 1,75 мкг/г. Вероятно, в кишечнике наряду с эвакуацией происходит и всасывание препарата и/или его метаболитов, так как к 5 ч в крови, плазме, селезенке, опухоли, поджелудочной железе и головном мозге было отмечено некоторое увеличение концентрации ^3H -соединений.

Тканями, накапливающими препарат, можно считать костный мозг и желудок, так как коэффициенты тропности (соотношение площадей под AUC к крови) составляют: костный мозг/кровь 18,28 и желудок/кровь 10,7, в то время как для всех других органов величины коэффициентов или незначительно превышали, или были меньше 1.

Таким образом, препарат быстро распределялся в организме животных, AUC для большинства органов и тканей варьирует от 30,0 до 47,0 мкг·ч/мл·г, в печени и почках AUC несколько больше 50–55 мкг·ч/г, что характерно для экскретирующих органов. Накопление препарата отмечено в костном мозге, где AUC больше в 18 раз, чем в крови и $\text{MRT}=46,9\text{ч}$. Высокие концентрации ^3H -соединения отмечаются (более 10 часов) в стенке желудка 79,5–10 мкг/г, что, вероятно, обусловлено его связыванием с рецепторами.

Литература

1. Кубасова И.Ю., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Поиск потенциальных противоопухолевых соединений среды аналогов гипоталамического гормона соматостатина // Российский Биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 123–7.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. – 2 изд., перераб. и доп. – М.: ОАО изд. «Медицина», 2005. – 832 с. (Методические указания по проведению доклинических исследований фармакокинетики фармакологических веществ и лекарственных средств. – С. 217–229).
3. Budun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A. et al. A new technique for tritium labeling of humic substances // Radiochimica Acta. – 2010. – 98(3). – P. 161–6.

Величины среднего времени удержания (MRT) для большинства органов и тканей были близки по своим значениям: 36ч–41ч. Сравнительно быстро освобождались от ^3H -соединений желудок и кишечник, 7,0ч и 17,65ч, соответственно.

В табл. 4 представлены данные анализа ^3H -радиоактивности фракций мочи и кала животных.

Как видно, максимальное количество ^3H -соединений было выведено мышами в интервале времени 5–24 ч, всего за 24 ч было выведено от введенной дозы 12,91 % с мочой и 72,25 % с калом, а за 72 ч кумулятивная экскреция составляла 94,1 %, в т.ч. 16,05 % с мочой и 78,05 % с калом. Соотношение выведенного количества ^3H -соединений с калом и мочой составляло 4,86 раза.

Средняя скорость экскреции была наибольшей с калом (6,16 % в ч) и мочой (0,63 % в ч) в период 0–5ч от введения препарата.

Заключение

В работе представлены результаты фармакокинетических исследований нового противоопухолевого препарата, пентапептида, аналога гипоталамического гормона соматостатина. Для идентификации АГГ и его количественного определения в биологических объектах был разработан метод получения меченого тритием препарата, путем химического синтеза ^3H -тетрапептида и цистеина. Для введения радиоактивной метки молекулы тетрапептида подвергались бомбардировке термически активированным газообразным тритием с последующей очисткой целевого продукта.

^3H -АГГ вводили мышам линии СВА с перивитой внутримышечно Ca755 перорально в лекарственной форме в дозе 10 мг (761,96 мКи)/кг. Определение концентрации ^3H -АГГ проводили в 15 органах и тканях мышей, включая Ca755. Образцы крови и органов для анализа отбирали в 8 временных точках в интервале времени 15 мин – 96 ч после введения препарата, а кал и мочу собирали в периоды 0–5 ч, 5–24 ч, 24–48 ч, 48–72 ч.

Фармакокинетические исследования показали доступность ^3H -АГГ для всех изученных органов и тканей, в том числе для головного мозга и Ca755. Препарат быстро всасывался и поступал в органы и ткани животных.

Максимальные концентрации ^3H -АГГ в легких, стенке желудка и костном мозге достигались до 15 мин., а в остальных органах и тканях – через 30 мин. после введения препарата.

Величины максимальных концентраций ^3H -АГГ в стенках желудка и кишечника, костном мозге, легких, печени и почках превышали таковую в крови, соответственно, в 104,6 и 20,8; 18,0; 2,0; 2,0 и 2,4 раза.

По соотношению площадей под AUC орган/кровь органами-мишенями для ^3H -АГГ были костный мозг и желудок, для которых величины показателей составляли 18,3 и 10,7, соответственно. Кумулятивная экскреция ^3H -АГГ с мочой и калом мышей в основном завершалась к 24 ч после введения препарата и к 72 ч составляла 16 и 78 %, соответственно, суммарно 94 % от введенной дозы.

УДК 616.9-097:616.51+616.322-002.2

Е.В. Сорокина^{1,2}, И.В. Манина²**НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ
НА ФОНЕ ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ВЭБ-ИНФЕКЦИИ**¹ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва²Институт Аллергологии и Клинической Иммунологии, Москва**Контактная информация**

Манина Ирина Владимировна, канд. мед. наук, врач аллерголог-иммунолог

адрес: 123104, Москва, ул. Малая Бронная, д.20, стр. 1; тел.+7(495)695-56-95

e-mail: irina.v.manina@gmail.com

Статья поступила 28.03.2012, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

Проведена сравнительная характеристика показателей иммунного статуса у 106 пациентов хронической крапивницей, эритемами и хроническим тонзиллитом на фоне персистирующей ВЭБ инфекции и пациентов с IgE-зависимым типом заболевания. В группах больных с признаками активации латентной ВЭБ-инфекции наблюдалась недостаточность клеточного звена иммунитета, что может свидетельствовать об угнетении иммунной системы в результате длительной персистенции ВЭБ, проявляющиеся в снижении общих Т-лимфоцитов CD3⁺, особенно выраженное у больных крапивницей; снижении уровня цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺; снижении уровня натуральных киллеров CD16⁺, главным образом у больных хроническим тонзиллитом и снижении CD25⁺.

Ключевые слова: персистирующая ВЭБ-инфекция, иммунный статус, эритема, крапивница, тонзиллит.E.V. Sorokina^{1,2}, I.V. Manina²**SOME CHANGES OF IMMUNE PARAMETERS
AT THE CHRONIC EBV-INFECTION**¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of RAMS, Moscow²Institute of Allergology and Clinical Immunology, Moscow**Abstract**

We carried out a comparative studying of immune system parameters at 106 patients with chronic EBV-infection and chronic urticaria, erythemas, relapsing tonsillitis against IgE-dependent diseases patients. We observed insufficiency of cellular immunity in groups of patients with activation of a latent EBV-infection. It testifies about to oppression of immune system as a result of activity EBV-infection. Oppression of immune system is expressed in decrease in the general T-lymphocytes of CD3⁺, (it is especially expressed at patients with urticaria); decrease in level of cytotoxic T-lymphocytes of CD8⁺; decrease in level of natural killers of CD16⁺ (it is strongly expressed at patients with chronic tonsillitis) and decrease in CD25⁺.

Key words: chronic EBV-infection, immune status, erythema, urticaria, tonsillitis.**Введение**

Одной из фундаментальных проблем современной онковирусологии является изучение молекулярных механизмов действия онкогенных вирусов, к числу которых относят и ВЭБ. Изучение заболеваний, вызываемых ВЭБ, являющимся представителем семейства гамма-герпесвирусов человека, в настоящее время является важной медицинской проблемой, привлекающей внимание специалистов различного профиля. Это обусловлено повсеместным распространением возбудителя, его специфической тропностью к иммунокомпетентным клеткам, системным поражением внутренних органов, широким диапазоном клинических форм заболеваний, а также отсутствием специфического лечения и профилактики. Значимость проблемы герпетических инфекций в последние годы возрастает, что объясняется также увеличением числа лиц со вторичными иммунодефицитами, при которых герпетические инфекции являются оппортунистическими. Для пациентов с иммунодефицитными состояниями (больных СПИДом, пациентов после трансплантации, новорожденных) герпесвирусные инфекции представляют опасность и могут приво-

дить к тяжелой болезни и в некоторых случаях к летальному исходу [2; 18]. С другой стороны герпесвирусная инфекция способствует развитию иммунодефицитных состояний, обусловленных недостаточностью различных звеньев иммунной системы и отсутствием возможности элиминировать вирус из организма. Кроме того, доказано, что ВЭБ может оказывать на организм воздействие вследствие своей способности вызывать латентную инфекцию и длительно персистировать в дифференцированных клетках иммунной системы, индуцируя различные нарушения как на хромосомном, так и на генном уровнях.

ВЭБ-инфицирование ассоциировано не только с доброкачественными заболеваниями, такими как инфекционный мононуклеоз, чаще встречающийся у детей, волосатоклеточная лейкоплакия, но также с возникновением ряда злокачественных лимфопролиферативных заболеваний, таких как лимфома Ходжкина, неХоджкинские лимфомы и Т-клеточные лимфомы, назофарингеальная карцинома, некоторые гистологические варианты рака желудка, легких, слюнных, околоушных, молочных желез [1; 4; 5; 27; 34]. При этом показана трансформирующая активность ряда протеинов ВЭБ,

одним из проявлений которой является способность инактивировать ген опухолевого супрессора p53, что ведет к нарушению процессов апоптоза [6]. Значительная роль в процессе малигнизации эпителиальных клеток отводится латентному мембранному протеину ВЭБ (LMP-I). Злокачественное течение инфекции, вызванной ВЭБ, может проявиться развитием В-клеточной лимфомы – лимфомы Беркитта, частота выявляемости которой в США составляет примерно 1200 пациентов ежегодно.

Впервые лимфома Беркитта была описана у детей Denis Burkitt в 1958 г. Хотя по данным литературы наиболее часто заболевание наблюдается у лиц мужского пола в детском и молодом возрасте, по данным SEER Национального института по надзору за онкологическими заболеваниями в 2007 году (National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology and End Results) частота встречаемости заболевания у взрослых пациентов старше 40 лет составила приблизительно 59 %.

Вирус Эпштейна-Барр относится к семейству Herpesviridae подсемейству Gammaherpesvirinae роду Lymphocryptovirus и является вирусом герпеса 4-го типа. Впервые вирус герпеса IV типа был обнаружен Эпштейном и его коллегами в 1964 г. при электронномикроскопическом исследовании клеток лимфомы Беркитта. Вирус Эпштейна-Барр, проникая в верхние отделы верхних дыхательных путей, внедряется в эпителиальные клетки и лимфоидную ткань рото- и носоглотки, в которых развивается воспалительный процесс. После первоначальной репликации в носоглотке вирус попадает в кровь и инфицирует В-лимфоциты, индуцируя секрецию иммуноглобулинов. В семействе герпесвирусов ВЭБ является уникальным по своей способности вызывать не цитолиз, а размножение пораженных клеток В-лимфоцитов. Геном вируса представлен двойной спиралью ДНК, в ней закодировано 30 полипептидов. Молекулярная масса 101×10^6 D, капсид имеет форму икосаэдра. ВЭБ вызывает латентную инфекцию, при которой в некоторых клетках макроорганизма пожизненно персистирует геном вируса, тогда как инфекционный вирус образуется в редкие периоды реактивации. Вирус Эпштейна-Барр способен поражать не только В-лимфоциты, но и клетки эпителия рото- и носоглотки, низкодифференцированные клетки эпителия канальцев слюнных желез и тимуса. Геном ВЭБ обнаруживается и в Т-лимфоцитах, эти клетки способны к экспрессии ранних и мембранных антигенов. Установлено, что ВЭБ трансформирует как зрелые, так и незрелые В-клетки. В зараженных клетках вирус осуществляет четыре функции: индукция бласттрансформации, продолжительная пролиферация клеток, поддержание фонда вирусной ДНК в инфицированных клетках, регуляция экспрессии вирусных генов. Антигены вируса, синтезирующиеся в процессе его репродукции, формируются в разное время и имеют разное биологическое значение [3].

Waldeyer's лимфатическое кольцо состоит из лимфоидной ткани, которая включает небные и глоточные миндалины и является частью первой линии защиты против патогенов. Большое число микроорганизмов может инфицировать эту ткань и являться причиной тонзиллита [20; 36]. Высокая частота идентификации ДНК ВЭБ (у 54,1 % больных) и белка LMP-1 (37,5 %) при хроническом тонзиллите у детей подтверждает, что миндалины могут являться резервуаром для ВЭБ, который может быть вовлечен в патогенез рецидивирующего тонзиллита [8; 11; 16].

Спектр патологических процессов у человека, в возникновении которых, как полагают, участвует ВЭБ, постоянно расширяется [19; 22; 23; 27; 28]. Достаточное число исследований, посвященных изучению особенностей клинических проявлений ВЭБ-инфекции, указывает на высокую частоту кожных проявлений при инфекционном мононуклеозе [25; 26; 35; 38]. По данным Fitzpatrick у 70–100 % больных инфекционным мононуклеозом кожные высыпания развиваются в ответ на проводимую терапию, чаще антибиотиками пенициллинового ряда, особенно ампициллином [14; 33]. Одиночные высыпания могут быть связаны с применением других антибиотиков, таких как амоксициллин, цефалексин, эритромицин и левофлоксацин. Обычно сыпь возникает на 7–10 день после начала антибиотикотерапии. Эритематозные или скарлатиноформные высыпания красного или медно-красного цвета локализируются на туловище и конечностях и регрессируют через 7 дней, сопровождаясь десквамацией. Сыпь может быть результатом продукции ВЭБ-индуцированных антител. Эти антитела впоследствии формируют иммунные комплексы, которые фиксируют комплемент. Экзантема, вызванная непосредственно ВЭБ-инфекцией, может встречаться в 5–15 % случаев, проявляется болезненными и зудящими высыпаниями, появляющимися с первых дней заболевания, и регрессирует в течение 1–6 дней. Периорбитальный отек может наблюдаться у 50 % больных инфекционным мононуклеозом. Примерно в 25 % случаев наблюдается энантема в виде 6–20 петехий диаметром 0,5–1,0 см на мягком и твердом небе, которые могут формировать крупные очаги.

Развитие ВЭБ-инфекции может сопровождаться развитием многоформной экссудативной эритемы (МЭЭ), узловатой эритемы, акроцианозом, кольцевидной центробежной эритемой, красным плоским лишаем, пальмарным дерматитом, холодовой крапивницей и кольцевидной гранулемой [19; 32; 37–39]. У пациентов с первичной ВЭБ-инфекцией наблюдалось развитие генитальных язв. ВЭБ является наиболее частой причиной развития синдрома Джанотти-Крости (Gianjtti-Crosti).

Много сообщений в литературе посвящено ассоциации ВЭБ-инфекции и аутоиммунных заболеваний. Эпидемиологические и экспериментальные исследования показали, что усиление репликации ВЭБ при хронических аутоиммунных болезнях, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и рассеянный склероз может активировать эндогенные человеческие ретровирусы [30–32]. Ряд исследований указывает на ассоциацию ВЭБ-инфекции и МЭЭ. Авторами описан случай развития МЭЭ на фоне продромальных явлений у 3-летней пациентки с локализацией на акральных частях туловища. Лабораторное исследование выявило высокие титры антител к ВПГ и ВЭБ на фоне нормальных показателей функциональных проб печени и негативных антител против других вирусов, включая ЦМВ, энтеровирус, гепатит А [9; 24; 26; 29; 38]. В литературе встречаются сообщения о ВЭБ-индуцированном синдроме Свита. Описан случай редкой необычной буллезной формы ВЭБ-ассоциированного синдрома Свита у 45-летнего больного, развившейся на фоне 3-дневной лихорадки, ассоциированной с артралгией. Высыпания локализовались на туловище и верхних конечностях.

Также вирусные инфекции, вызванные вирусом простого герпеса, коксаки-вирусом А и В, гепатитом В, ВЭБ, играют важную роль в этиологии ангиоотечек у детей.

Подавляющее большинство случаев холодовой крапивницы являются спонтанными, однако считается, что до 5 % случаев может быть связано с рядом инфекций – сифилисом, боррелиозом, корью, ветряной оспой, гепатитами, мононуклеозом, ВИЧ. Наблюдается частая ассоциация холодовой и аквагенной крапивницы с активацией вирусных инфекций [13; 15; 17; 39]. Зарубежные авторы представили клиническое наблюдение развития прогрессирующих билатеральных периорбитальных отеков на фоне лимфаденопатии шейных и подчелюстных лимфоузлов. Лабораторные признаки инфекционного мононуклеоза выражались в позитивном моноспот-тесте и наличии антител класса IgM к капсидному антигену ВЭБ. Антитела класса IgG против EBV-VCA и EBV ядерного антигена (EBNA) отсутствовали. Результаты диагностики с помощью ПЦР показали 306,700 ДНК ВЭБ копий/мл, что позволило установить диагноз инфекционного мононуклеоза [12]. Периорбитальный отек может являться манифестацией инфекционного мононуклеоза. У таких пациентов ошибочно выставляют диагноз ангиоотеки, контактный дерматит, нефротический синдром или тиреоидит. Этиология периорбитального отека неизвестна, но назофарингеальная репликация вируса, лимфопрлиферация или лимфатическая обструкция могут являться провоцирующими факторами [7; 10; 21].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей иммунологических нарушений у пациентов с хронической крапивницей, эритемами и хроническим тонзиллитом на фоне персистирующей ВЭБ инфекции. Проведена сравнительная характеристика показателей иммунного статуса у 106 пациентов хронической крапивницей, эритемами и хроническим тонзиллитом на фоне персистирующей ВЭБ инфекции и пациентов с IgE-зависимым типом заболевания (крапивница, рино-конъюнктивальный синдром).

Материалы и методы

Все пациенты до начала исследования были разделены на 3 группы.

В **первую** группу были включены 28 больных хронической спонтанной крапивницей, 21 больной фиксированной эритемой и 13 больных многоформной экссудативной эритемой, с лабораторными признаками активности ВЭБ-инфекции при отсутствии сенсibilизации к основным причинно-значимым аллергенам. Эту группу составили 29 мужчин и 33 женщины в возрасте от 18 до 52 лет. Длительность заболевания крапивницей варьировала от 2 месяцев до 5 и более лет; фиксированной эритемой и многоформной экссудативной эритемой от 4 месяцев до 10 лет.

В состав **второй** группы включены 25 больных хроническим тонзиллитом и явлениями лимфаденита в шейной или затылочной области и лабораторными признаками персистирующей ВЭБ инфекции. Длительность заболевания варьировала от 2 месяцев до 5 и более лет.

Третью группу составили 40 пациентов с IgE-зависимым типом заболевания (крапивница и рино-конъюнктивальный синдром), не имеющих признаков активации персистирующей ВЭБ-инфекции. Средний возраст составил $24,3 \pm 9,8$ лет. Суммарный стаж заболевания составил от 1 года до 30 лет, средний срок заболевания составил $9,5 \pm 6,9$ лет. Всем больным было проведено клинико-лабораторное исследование (табл. 1 и 2).

Лабораторные методы исследования включали клинический анализ крови и мочи, биохими-

ческий анализ крови, комплекс серологических реакций на сифилис, а также тест на ВИЧ-инфицирование, вирусный гепатит С и В. Иммунологические методы исследования включали оценку фагоцитарной активности нейтрофилов по определению фагоцитарного индекса и в НСТ тесте в спонтанном и индуцированном вариантах.

Содержание субпопуляций лимфоцитов в крови проводили с использованием моноклональных антител методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FacsCalibur (Becton Dickinson, США). Использовали FITC панель моноклональных антител (производства «Сорбент», ФГУ Институт Иммунологии Минздравсоцразвития РФ) к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD71, CD25, HLA-DR. ИРИ рассчитывали по соотношению $CD4^+/CD8^+$.

Содержание общих иммуноглобулинов IgA, IgG, IgM классов проводили методом турбидиметрии на анализаторе Screen Master Plus (Hospitex Diagnostics S.A., Switzerland) с использованием моноспецифических антисывороток АО НПО «Синтеко». Уровень общего IgE определяли в ИФА.

Исследование уровня интерферона проводили по методу С.С. Григорян. В цельной гепаринизированной крови микрометодом *in vitro* определяли уровень сывороточного интерферона, а также его спонтанную и индуцированную продукцию лейкоцитами. Продукцию индуцированного IFN- α определяли при стимуляции лейкоцитов ВБН, продукцию IFN- γ лейкоцитами при воздействии митогеном – фитогемагглютинином (ФГА). Метаболическую и цитохимическую активность фагоцитов определяли путем спонтанного теста с НСТ (нитросиний тетразолий), методом хемилюминесценции, индуцированную *in vitro* фагоцитозом частиц опсонизированного зимозана (усиленной добавление люминола, люцигенина) с использованием люцинометра L1251 (LKB, Sweden). Титры специфических антител в сыворотке крови к вирусам ЦМВ, ВЭБ, Парвовирус В19 определяли методом ИФА. Всем больным были проведены микробиологические исследования мазков из отделяемого зева, носоглотки, исследования секретов слюнных желез, и других биологических жидкостей на наличие ДНК ЦМВ, ВПГ, ВЭБ методом ПЦР.

Результаты и обсуждение

На основании анализа полученных результатов выявлено, что у пациентов первых трех групп (с хронической крапивницей, эритемами и хроническим тонзиллитом) показатели НСТ-теста были в пределах нижней границы нормы, в то время как у больных с IgE-зависимым типом заболевания (крапивница, рино-конъюнктивальный синдром), не имеющих признаков активации ВЭБ-инфекции, этот показатель был в пределах верхней границы нормы и составил $20,6 \pm 4,2$ % (табл. 3).

Показатели интерферонового статуса у пациентов с признаками ВЭБ-инфекции были значительно ниже референтных значений. IFN- α в группах пациентов, имеющих признаки активации ВЭБ-инфекции, были достоверно ниже нормы, наиболее низкие значения отмечены у пациентов, страдающих хроническим тонзиллитом (до 160,0ед/мл). Значения ниже референтных, но выше, чем у пациентов с тонзиллитами, отмечены у пациентов с хронической спонтанной крапивницей на фоне персистирующей ВЭБ-инфекции (213,0 ед/мл; табл. 4). При сравнении показателей клеточного звена иммунитета обнаружены следующие изменения (табл. 5).

Таблица 1

Содержание специфических антител к ВЭБ в сыворотке крови больных хронической спонтанной крапивницей и эритемами

Показатель	Нормальные значения	Средние значения в n=62
Антитела IgM к капсидному антигену ВЭБ/VCA	<0,3	0,67±0,54
Антитела IgG к капсидному антигену ВЭБ/VCA	<1ОП	17,73±5,88
Антитела IgG к раннему антигену ВЭБ/EA	<0,3ОП	1,24±0,9
Антитела IgG к ядерному антигену ВЭБ/EBNA	<5ед/мл	75,02±27,43

Таблица 2

Качественное определение ДНК ВЭБ методом ПЦР в секрете слюнных желез

Группа больных			
хроническая спонтанная крапивница n=28	Эритемы n=34	хронический тонзиллит n=25	IgE-зависимые лица (крапивница, риноконъюнктивальный синдром) n=40
+	+	+	-

Таблица 3

Сравнительная характеристика фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у больных хронической крапивницей, эритемами и хроническим тонзиллитом на фоне персистирующей ВЭБ-инфекции

Показатель	Нормальные значения	Группа 1		Группа 2	Группа 3
		Хроническая спонтанная крапивница n=30	Эритема фиксированная и эритема многоформная экссудативная n=32	Хронический тонзиллит n=25	IgE-зависимый тип заболевания (крапивница, риноконъюнктивальный синдром) n=40
Фагоцитарный индекс	40-80%	71,480±13,46	67,95±21,22	Нет данных	73,4±3,8
НСТ ЦП	0,1-0,32 у.е	0,272±0,13	0,3±0,11	Нет данных	Нет данных
НСТ	5-23%	9,7±0,8*	8,4±1,1*	8,8±6,4*	20,6±4,2*

* $p<0,05$ достоверность различий между группами 1,2 и группой сравнения 3.

Таблица 4

Сравнительная характеристика основных показателей интерферонового статуса у больных крапивницей, эритемами и хроническим тонзиллитом на фоне персистирующей ВЭБ-инфекции

Показатель	Нормальные значения	Группа 1		Группа 2
		Хроническая спонтанная крапивница n=30	Эритема фиксированная и эритема многоформная экссудативная n=32	Хронический тонзиллит n=25
IFN-α	640-1280 ед./мл	213,0±127,2 *	251,2±148,4*	160,0±50*

* $p<0,05$ достоверность различий между группой 1 и группой 2.

Таблица 5
Сравнительный состав субпопуляций лимфоцитов у больных крапивницей, эритемами и хроническим тонзиллитом на фоне персистирующей ВЭБ-инфекции

Показатель	Норма	+Группа 1(а) n=30	++Группа 1(б) n =32	+++Группа 2 n =25	++++Группа 3 n =40
CD3	60-76%	53,2±4,9 **, **	71,8±1,6 *, ##	71,4±5,8 **, ###	59,5±4,5 ##, ###
	1100-1700 ×10 ⁶ г/л	1047,1±242,5 **, **	1891,1±105,3 *, ##	2612,4±674,2 **, ###	1332,6±269,0 *, ##, ###
CD4	38-46%	37,1±6,6 **, **	42,5±1,5 *, ##	42,1±4,1	37,1±2,9 ##
	700-1100 ×10 ⁶ г/л	786,8±250,5 *, **, **	1334,3±96,0 *, ##	1529±391,0 **, ###	829,9±172,6 ##, ###
CD8	31-40%	26,6±5,54	26,9±1,2	25,5±3,5	25,2±1,8
	500-1000 ×10 ⁶ г/л	592,9±256,9 **, **	694,0±60,6	945,1±294,3 **, ###	567,0±115,1 ###
ИРИ	1,2-2,0	1,7±0,1	1,7±0,1	1,7±0,3	1,7±0,2
CD16	10-19%	15,1±5,7 **, #	11,4±1,1	8,5±1,7 **, **	10,5±1,3 #
	200-400 ×10 ⁶ г/л	345,1±178,7 **, #	302,2±38,6 ##	201,4±23,2 **, **	235,2±53,1 ##
CD72	11-16%	18,8±5,8 **, **	9,9±0,8 *, ##	10,3±1,3 **, ###	21,8±1,6 ##, ###
	200-400 ×10 ⁶ г/л	448,7±176,1 *, **, **	269,2±36,7 *, ##	204,6±21,2 **, ###	485,7±103,3 ##, ###
CD25	8-12 %	10,4±6,1 **, **	6,1±4,8 ##	3,85±2,6 **, ###	16,9±3,0 ##, ###
CD95	41-63%	30,6±11,3 **, **	35,9±10,7 **, **	65,3±3,9 **, **, **	Нет данных
CD21	11-16%	18,8±9,7 **, **	11,3±4,3	10,6±2,7 **, **	Нет данных
* - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 1(а) и группой 1(б). ** - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 1(а) и группой 2. *** - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 1(б) и группой 2. # - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 1(а) и группой 3. ## - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 1(б) и группой 3. ### - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 2 и группой 3.					
			+Группа 1(а) Хроническая спонтанная крапивница ++Группа 1(б) Эритемы фиксированная и многоформная экссулативная +++Группа 2 Хронический тонзиллит ++++Группа 3 IgE-зависимые заболевания (крапивница, рино-конъюнктивный синдром)		

Таблица 6
Сравнительная характеристика уровней общих Ig в сыворотке крови больных крапивницей, эритемами и хроническим тонзиллитом при активации ВЭБ

Показатель	Норма	Группа 1		+++Группа 2	++++Группа 3
		+1 (a) n=30	++1 (б) n =32	n =25	n =40
IgG	7,14-17 г/л	13,1±1,9	11,8±0,6	12,4±2,2	15,2±1,2
IgA	1,79-5,0 г/л	2,2±0,8	2,3±0,2	1,2±0,2	1,6±0,2
IgM	1,4-2,4 г/л	1,7±0,6	1,7±0,1	1,1±0,2	1,1±0,2
IgE	0-100 г/л	129,1±98,4 *	149,2±114,6 *	20,0±9,5 *, ***,	268,7±173,3 **, ***,
* - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 1 и группой 2. ** - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 1 и группой 3. *** - $p < 0,05$ достоверность различий между группой 2 и группой 3.		+Группа 1(a) Хроническая спонтанная крапивница ++Группа 1(б) Эритемы фиксированная и многоформная эксудативная +++Группа 2 Хронический тонзиллит ++++Группа 3 IgE-зависимые заболевания (крапивница, рино-конъюнктивальный синдром)			

1. Значения CD3 были в пределах нижней границы референтных значений в группах пациентов с кожной патологией. При этом у больных хронической спонтанной крапивницей наблюдается снижение абсолютных и относительных значений CD3, в то время как в группе больных эритемами относительные значения CD3 – в пределах нормы на фоне незначительного повышения абсолютных значений. В группе больных хроническим тонзиллитом уровень CD3 также в пределах нормальных значений. Таким образом, выявлены существенные различия в абсолютном содержании CD3+ клеток у пациентов с рецидивирующей крапивницей и эритемами на фоне персистирующей вирусной инфекции ($1047,100 \pm 242,57$ и $1891,1 \pm 105,3 \times 10^6$ г/л). Низкие значения CD3 клеток, вероятно, играют ключевую роль в каскадных реакциях гистаминолабации.
2. Показатели CD4 и CD16 у всех были в пределах референтных интервалов, иммунорегуляторный индекс ИРИ не изменен. Однако в группе больных хроническим тонзиллитом наблюдалось снижение CD16 до 8,5 %. Наблюдалось снижение относительных и абсолютных значений CD8 во всех исследуемых группах. В группе больных с кожной патологией наблюдались различия в уровнях CD72: у больных крапивницей относительные и абсолютные значения были значительно повышены до $18,8 \pm 5,84$ %; $448,7 \pm 176,1$ г/л, в то время как у больных эритемами этот показатель был существенно снижен до $9,9 \pm 0,8$ %.
3. На фоне персистенции ВЭБ-инфекции наблюдались изменения показателей CD25. Наиболее низкие значения выявлены у пациентов с хроническим тонзиллитом ($3,85 \pm 2,68$ %). В группе пациентов с кожной патологией выявлены существенные различия в зависимости от диагноза. У пациентов с клиническими проявлениями крапивницы показатель CD25 составил $10,4 \pm 6,1$ %, а у пациентов с эритемами несколько ниже – $6,1 \pm 4,8$ %. Показатели CD95 у пациентов в группах на фоне персистирующей ВЭБ-инфекции были различны. Отмечено, что у больных хроническим тонзиллитом значения CD95 были выше референтных значений ($65,3 \pm 3,9$ %), в то время как у пациентов с проявлениями крапивницы и эритемами значительно ниже нормальных значений ($30,6 \pm 11,3$ % и $35,9 \pm 10,7$ % соответственно). Вероятно, снижение маркера CD95 играет важную роль в развитии кожной патологии на фоне персистенции ВЭБ-инфекции.
4. CD21 является важным рецептором для распознавания вирусов на эпителиальных клетках и В-лимфоцитах, одновременно являясь рецептором для C3d компонента комплемента. В группе больных кожными заболеваниями вы-

явлены существенные различия в показателях CD21: у больных крапивницей отмечается повышенный уровень CD21, составляющий $18,8 \pm 9,7$ %, в то время как у больных эритемами этот показатель находился на нижней границе нормальных значений ($11,3 \pm 4,3$ %). У больных хроническим тонзиллитом значение CD21 было снижено и составляло $10,6 \pm 2,7$ %.

Таким образом, у всех пациентов обследуемых групп с признаками активации персистирующей ВЭБ-инфекции наблюдались признаки недостаточности клеточного звена иммунитета, что может свидетельствовать об угнетении иммунной системы в результате длительной персистенции ВЭБ, проявляющиеся в снижении общих Т-лимфоцитов CD3, особенно выраженное у больных крапивницей; снижении уровня цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺; снижении уровня натуральных киллеров CD16⁺, главным образом у больных хроническим тонзиллитом и снижении CD25.

При исследовании показателей гуморального звена иммунитета у больных с хроническим тонзиллитом, протекающем на фоне персистирующей ВЭБ-инфекцией выявлено нарушение соотношения основных классов иммуноглобулинов, выражающееся в снижении уровней IgA и IgM (табл. 6). Аналогичный дисбаланс выявлен в группе пациентов с IgE-зависимым типом заболевания. В группах с кожной патологией уровни иммуноглобулинов были в пределах нормы. Вероятно, это отражает умеренную степень репликации вируса у обследуемых больных.

Заключение

На основании результатов, представленных в статье, на современном этапе представляется актуальным изучение влияния степени репликации ВЭБ на формирование вторичных иммунодефицитных состояний.

Ранее основными парадигмами для изучения ВЭБ являлись культуры клеток, пациенты с онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, лица, инфицированные ВИЧ.

В настоящее время спектр заболеваний, в развитии и прогрессировании которых ведущая роль отводится ВЭБ-инфекции, значительно расширился. В свою очередь, длительная персистенция ВЭБ способна привести к ряду иммунологических нарушений и изменить течение некоторых заболеваний, что показано в данном исследовании на примере некоторых дерматозов и хронического тонзиллита.

Несмотря на то, что ВЭБ, являясь лимфотропным вирусом, преимущественно поражает В-лимфоциты, стимулируя их пролиферацию, формирующиеся под действием вируса изменения затрагивают все звенья иммунной системы. Во всех обследуемых группах у больных с признаками активации латентной ВЭБ-инфекции наблюдалась недостаточность клеточного звена иммунитета, что может свидетельствовать об угнетении иммунной системы в результате длительной персистенции ВЭБ, проявляющиеся в снижении общих Т-лимфоцитов CD3, особенно выраженное у больных крапивницей; снижении уровня цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺; снижении уровня натуральных киллеров CD16⁺, главным образом у больных хроническим тонзиллитом и снижении CD25.

Полученные данные расширяют существующие на сегодняшний день фундаментальные знания о роли потенциально онкогенного вируса Эпштейна-Барр в патогенезе некоторых дерматозов и хронических воспалительных заболеваний ЛОР-органов и влиянии длительной персистенции ВЭБ на клетки иммунной системы. Знание причин, механизма развития повреждений иммунной защиты организма при ВЭБ-инфекции необходимы для своевременной диагностики, разработки и проведения эффективных мер для коррекции иммунологи-

ческих нарушений, а также позволяют контролировать ВЭБ-ассоциированные хронические воспалительные процессы в эпителии слизистой, которые могут способствовать онкогенезу.

Дальнейшее изучение этих иммунологических нарушений, возможно, поможет расширить понимание сложного комплекса молекулярно-биологических, вирусологических и иммунологических закономерностей, которые лежат в основе патогенеза ВЭБ-ассоциированного иммунодефицита.

Литература

1. Гончарова Е.В. Вирус Эпштейна-Барр и рак желудка: поиск и анализ вирусологических и молекулярно-генетических маркеров экспериментальное исследование). – Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Москва, 2001. – 24 с.
2. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека, руководство для врачей. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 303 с.
3. Львов Д.К. Медицинская вирусология. Руководство. – М.: Медицинское информационное агентство, 2008. – 655 с.
4. Севостьянова Н.В. Особенности и механизмы экспрессии молекулярно-биологических маркеров опухолевого роста при раке легкого. – Дисс. ... д-ра мед. наук. – Томск, 2004. – 48с.
5. Чойнзонов Е.Л. Рак верхних отделов дыхательного и пищеварительного тракта (эпидемиологические и иммунологические аспекты, оценка эффективности лечения). – Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – Томск, 1995. – 46 с.
6. Archibald S. Perkins and Jonathan W. Friedberg. Burkitt Lymphoma in Adults // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. – 2008. – P. 341–8.
7. Bass M.H. Periorbital edema as the initial sign of infectious mononucleosis // J Pediatr. – 1954. – 45. – P.204–5.
8. Chagas A.C., Endo L.H., Santos W.L.C. et al. Is there a relationship between the detection of human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus in Waldeyers ring tissues? // Int J Pediatr Otorhinolaryngol. – 2006. – 70(11). – P. 1923–7.
9. Chen C.L., Chow K.C., Wong C.K. et al. A study on Epstein-Barr virus in erythema multiforme // Arch Dermatol Res. – 1998. – 290(8). – P. 446–9.
10. Decker G.R., Berberian B.J. Periorbital and eyelid edema: the initial manifestation of acute infectious mononucleosis // Cutis. – 1991. – 47. – P. 323–4.
11. Endo L.H., Ferreira D., Montenegro M.C. et al. Detection of Epstein-barr virus in tonsillar tissue of children and the relationship with recurrent tonsillitis // Int J Pediatr Otorhinolaryngol. – 2001. – 58. – P. 9–15.
12. Eliane Pedra Dias, Monica Lage da Rocha // Detection of Epstein-Barr virus in recurrent tonsillitis // Brasileira de Otorrinolaringologia. – 2009. – 75(1). – P. 30–4.
13. Fearfield L.A., Gazzard B., Bunker C.B. Aquagenic urticaria and human immunodeficiency virus infection: treatment with stanozolol // Br J Dermatol. – 1997. – 137. – P. 620–2.
14. González-Delgado P., Blanes M., Soriano V. et al. Erythema multiforme to amoxicillin with concurrent infection by Epstein-Barr virus // Allergol Immunopathol (Madr). – 2006. – 34(2). – P. 76–8.
15. Haas N., Birkle-Berlinger W., Krone B., Henz B.M. Seasonal variations in the incidence of acute urticaria in children - possible implications regarding pathogenesis // Allergologie. – 2004. – 27. – P. 35–9.
16. Ikeda T., Kobayashi R., Horiuchi M. et al. Detection of lymphocytes productively infected with Epstein-Barr virus in non-neoplastic tonsils // J Gen Virol. – 2000. – 81. – P. 1211–6.
17. Katsarou-Katsari A., Makris M., Lagogianni E. et al. Clinical features and natural history of acquired cold urticaria in a tertiary referral hospital: a 10-year prospective study // J Eur Acad Dermatol Venereol. – 2008. – 22. – P. 1405–11.
18. Kimura H. Pathogenesis of chronic active Epstein-Barr virus infection: is this an infectious disease, lymphoproliferative disorder, or immunodeficiency // Rev Med Virol. – 2006. – 16(4). – P. 251–61.
19. Klaus Wolff, Lowell A. Goldsmith, Katz S.I. et al. / Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. – 7th ed. – New York: Mc Graw Hill, 2008. – P. 1858–9.
20. Kunitomo M., Tamura S., Yoshie O., Tabata T. Epstein-Barr virus in Waldeyer lymphatic tissue // Adv Otorhinolaryngol Basel Karger. – 1992. – 47. – P. 151–60.
21. Long S.S. Periorbital edema as the initial sign of infectious mononucleosis // J Pediatr. – 2004. – 145. – P. 127.
22. Maeda E., Akahane M., Kiryu S. et al. Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review // Jpn J Radiol. – 2009. – 27(1). – P. 4–19.
23. Magdei C., Cusnir V., Bârcă L. Epstein Barr and cytomegaloviruses in ocular pathology // Oftalmologia. – 2010. – 54(1). – P. 23–8.
24. Maggio M.C., Liotta A., Cardella F. et al. Stevens-Johnson syndrome and cholestatic hepatitis induced by acute Epstein-Barr virus infection // Eur J Gastroenterol Hepatol. – 2011. – 23(3). – P. 289.
25. Mendoza N., Diamantis M., Arora A. et al. Mucocutaneous manifestations of Epstein-Barr virus infection // Am J Clin Dermatol. – 2008. – 9(5). – P. 295–305.
26. Nakai H., Sugai K., Usui C. et al. A case of erythema multiforme associated with primary Epstein-Barr virus infection // Pediatr Dermatol. – 2011. – 28(1). – P. 23–5.
27. Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma // I. Clin. Pathol: Mol. Pathol. – 2000. – 53. – P. 248–54.
28. Oncel C. A rare clinical presentation of Epstein-Barr virus // Braz J Infect Dis. – 2010. – 14(2). – P. 211–2.
29. Özdemir P.G., Yazıcıoğlu M., Aylanç H. et al. EBV-induced erythema multiforme: a case report // Allergol Immunopathol (Madr). – 2011. – 39(2). – P. 116–8.
30. Posnett D.N. Herpesviruses and autoimmunity // Curr Opin Investig Drugs. – 2008. – 9(5). – P. 505–14.
31. Ramos-Casals M., Cuadrado M.J., Alba P. et al. Clinical guidelines for the management of acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus // Minerva Med. – 2009. – 100(6). – P. 437–46.
32. Ramos-Casals M., Cuadrado M.J., Alba P. et al. Acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus: description of 23 cases and review of the literature // Medicine (Baltimore). – 2008. – 87(6). – P. 311–8.
33. Shiohara T., Kano Y. A complex interaction between drug allergy and viral infection // Clin Rev Allergy Immunol. – 2007. – 33(1–2). – P. 124–33.
34. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma // J Clin Pathol. – 2000. – 53. – P. 255–61.
35. Wanner M., Pol-Rodriguez M., Hinds G. et al. Persistent erythema multiforme and CMV infection // J Drugs Dermatol. – 2007. – 6(3). – P. 333–6.
36. Yoda K., Aramaki H., Yamauchi Y.S., Kurata T. Detection of herpes simplex and Epstein-Barr viruses in patient with acute tonsillitis // Abstracts III International Symposium on Tonsils. Sapporo Japan. – 1995. – P. 31.
37. Yokoyama S., Kasahara M. Epstein-Barr virus-associated erythema nodosum after living-donor liver transplantation: a case report // A Liver Transpl. – 2009. – 15(4). – P. 446–8.
38. Zawar V., Chuh A., Sankalecha S. et al. Erythema multiforme-like lesions in the course of infectious mononucleosis // J Dermatol Case Rep. – 2009. – 28(3). – P. 44–6.
39. Zuberbier T. Urticaria // Allergy. – 2003. – 58. – P. 1224–34.

УДК 616-006.81:615.371/372:612.017.1

А.Е. Бармашов, Г.З. Чкадуа, И.Н. Михайлова, З.А. Соколова, М.В. Огородникова, Л.Ф. Морозова,
К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА МЕТОДОМ *ELISPOT* У БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ДЕНДРИТНОКЛЕТОЧНУЮ ВАКЦИНУ

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

Контактная информация:

Бармашов Александр Евгеньевич, аспирант лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

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

e-mail: alba0686@gmail.com

Статья поступила 23.08.2012, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

В настоящем исследовании изучался иммунологический ответ у онкологических больных, которые получали дендритноклеточную вакцину. Оценка противоопухолевого иммунитета проводилась методом *ELISPOT* – одним из основных способов определения количества цитокин-продуцирующих клеток. Лимфоциты инкубировались в присутствии фитогемагглютинаина (ФГА) или опухолевого лизата. Было установлено, что в процессе вакцинации число секретирующих интерферон- γ клеток в двух указанных пробах увеличивается в несколько раз у 8 пациентов. У 5 больных было зафиксировано уменьшение данного показателя. У одного пациента нет изменения в количестве активированных лимфоцитов на фоне иммунизации. Была обнаружена взаимосвязь между изменением числа интерферон- γ -продуцирующих клеток в двух группах. У 4 больных с повышением иммунного ответа в присутствии лизата увеличивается также и неспецифическая реакция на ФГА. У 1 пациента при уменьшении числа клеток в опытной пробе уменьшается и число клеток при инкубации с ФГА.

Ключевые слова: меланома, дендритноклеточная вакцина, *ELISPOT*, противоопухолевый иммунитет, интерферон- γ .

A.E. Barmashov, G.Z. Chkadua, I.N. Mikhailova, M.V. Ogorodnikova, L.F. Morozova,
K.A. Baryshnikov, L.V. Demidov, A.Yu. Baryshnikov

THE ESTIMATION OF ANTICANCER RESPONSE BY *ELISPOT* IN PATIENTS TREATED WITH DENDRITIC CELL VACCINE

FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

Abstract

In this study we have examined the immune response in cancer patients treated with dendritic cell vaccine. Anti-tumor response was estimated by *ELISPOT* method, one of the basic methods determining the number of cytokine-produced cells. Lymphocytes were incubated with phytohaemagglutinin (PHA) and tumor lysate. 14 patients were enrolled in this study. It was determined that the number of interferon- γ secreted cells increased few-fold in 8 patients during the vaccination, the number of interferon- γ secreted cells reduced in 5 patients and there was no response in one patient. Moreover, we have observed that the increasing of immune response in 4 patients was correlated with the response to PHA and the decreasing of immune response was correlated with the decrease of immune response to PHA in one patient. Based on data obtained we conclude that the dendritic vaccine is effective.

Key words: melanoma, dendritic cell vaccine, *ELISPOT*, antitumor immunity, interferon- γ .

Введение

Успешное лечение онкологических заболеваний является одной из центральных проблем медицины. Сейчас основными методами противоопухолевой терапии являются: хирургическое удаление опухоли, химиотерапия, лучевая терапия. Но все эти методы не позволяют полностью уничтожить опухоль и ее метастазы. Насущной проблемой медицины является разработка новых терапевтических методов борьбы с онкологическими заболеваниями. Одним из направлений этой работы является создание противоопухолевых вакцин [3; 6; 20]. К ним относятся: коктейль рекомбинантных опухолевых антигенов, рекомбинантные микроорганизмы, онколитические вирусы, анти-идиотипические антитела, ДНК, генно-инженерные конструкции, облученные цельные опухолевые клетки и клетки иммунной системы (в частности, аутологичные дендритные клетки, нагруженные опухолевыми

антигенами) [21; 23; 25; 26; 32]. Кроме того, одной из применяемых вакцин являются дендритомы, которые в опытах *in vitro* показали большую эффективность по сравнению с дендритноклеточной вакциной [7; 18].

В России проходили клинические испытания вакцины на основе опухолевых клеточных линий меланомы, трансфицированных геном tag-7 и ГМ-КСФ и аутологичные дендритные клетки больных нагруженных опухолевым лизатом [9; 11–15]. Целью создания подобного рода препаратов является увеличение у пациентов популяции CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), способных уничтожать опухолевые клетки [4; 5; 30]. Вакцины на основе дендритных клеток в настоящее время проходят I и II фазу клинических испытаний как в России, так и за рубежом [1; 16; 27]. Изучается их действие при разных нозологиях: раке мочевого пузыря, колоректальном раке, меланоме, нейроглиоме и др. [1; 8; 16; 17].

Для оценки степени выраженности Т-клеточного звена иммунитета на фоне иммунизации данной вакциной используют метод *ELISPOT*. *ELISPOT* (Enzyme-Linked ImmunoSpot) – твердо-фазная модификация метода иммуноферментного анализа. Изначально *ELISPOT* был разработан С. Czerkinsky et al. в 1983 г. [22] для подсчета В-лимфоцитов, продуцирующих специфические антитела, а затем был адаптирован для разных задач, в особенности для идентификации и подсчета цитокин-продуцирующих клеток с точностью вплоть до отдельных клеток. *ELISPOT* позволяет визуализировать вещество, продуцируемое отдельными активированными клетками, и предоставляет как качественную (тип продуцируемого вещества), так и количественную (число активированных клеток) информацию. Метод *ELISPOT* является удобным и надежным для оценки иммунного ответа у больных злокачественными новообразованиями, получающих иммунотерапию [2; 33].

Цель работы – оценить иммунологическую эффективность дендритноклеточной вакцины методом *ELISPOT* у больных меланомой.

Материалы и методы

Исследование проводилось на моноклеллах 14 больных меланомой кожи. Вакцину вводили больным внутритрикожно в дозе 1×10^6 аутологичных дендритных клеток. Интервалы между первыми 4 инъекциями составляли 2 нед., далее иммунизация больных проводилась 1 раз в месяц [16]. Вакцинация продолжалась вплоть до развития прогрессирования. На разных этапах вакцинации проводился забор крови, условно обозначенный «точка».

Моноклеары периферической крови получали путем разделения в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл) по стандартной методике [31].

Клеточную линию меланомы человека mel Kog [10] культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 10мМ HEPES (Sigma, США), 2мМ L-глутамин (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицина (ICN, США), 0,1% 1000^x раствора аминокислот и 0,1% 1000^x раствора витаминов (ПанЭко, Россия). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня. Для открепления клеток с пластика использовали раствор Версена. Для получения опухолевого лизата проводили процедуру замораживания–оттаивания клеток линии mel Kog 5 раз. Полученный лизат разливали по аликвотам и хранили при -80 °С. Клеточная линия mel Kog отличается отсутствием антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов и наличием различных опухолеассоциированных антигенов [10].

При постановке *ELISPOT* раскапывали порокровные МКА к ИФН- γ на белок-связывающую мембрану 96-луночного планшета по 50 мкл на лунку и инкубировали 18 ч при 37 °С и 5 % CO₂. Плато отмывали от несвязавшихся МКА стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS). Блокировали белок-связывающую мембрану средой RPMI-1640 содержащей 5 % ТЭС. Инкубировали 2 ч при комнатной температуре, после чего блокирующую среду сливали. В лунки вносили моноклеары по 5×10^4 клеток на лунку в присутствии ФГА в концентрации 10 мкг/мл, или по 1×10^5 клеток на лунку в присутствии лизата (из расчета лизат из 10 000 опухолевых клеток на 100 000 лимфоцитов). Инкубировали 18 ч при 37 °С и 5 % CO₂. После инкуба-

ции 10-кратно отмывали от клеток буферным раствором, содержащим 0,1 % Tween-20. Затем, добавляли 100 мкл на лунку биотинилированных МКА к интерферону- γ , разведенных 1:1000 в PBS с 0,5% бычьим сывороточным альбумином и 0,1% Tween-20, инкубировали 2 ч и отмывали от несвязавшихся антител. Затем добавляли 0,01 %-ную щелочную фосфатазу по 100 мкл на лунку. Инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Плато отмывали и добавляли субстрат к щелочной фосфатазе по 100 мкл на лунку. Плато инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Для остановки реакции плато отмывали проточной дистиллированной водой в течение 2 минут. Плато высушивали при комнатной температуре в темноте. Количество пятен в лунках определяли на приборе *ELISPOT-reader*.

Результаты и обсуждение

Изучалась продукция ИФН- γ лимфоцитами крови 14 больных меланомой, получавших аутологичную дендритноклеточную вакцину. Результаты работы представлены в табл. 1. При активации моноклеаров опухолевым лизатом у 8 пациентов наблюдалось повышение интерферон- γ -продуцирующих клеток в процессе вакцинации (Б.А.В., М.А.В., С.Н.М., С.Л.В., Т.А.В., К.Е.С., Т.О.В., Г.С.Л.; табл. 1). Отметим, что статистически достоверное увеличение числа исследуемых клеток зафиксировано у 4 из 8 пациентов (М.А.В., С.Н.М., С.Л.В., Г.С.Л.). У 5 больных число клеток, продуцирующих интерферон- γ , уменьшалось в процессе вакцинации (П.А.В., С.Р.В., П.Н.А., Г.С.Д., Д.Ф.А.). Достоверное отличие имеется только у 2 из них (С.Р.В., П.Н.А.). У одного пациента нет изменения в числе активированных лимфоцитов на фоне вакцинотерапии (В.Е.В.). Полученные результаты позволяют говорить о стимуляции Т-клеточного иммунитета у большинства пациентов получающих дендритноклеточную вакцину. Кроме того, следует отметить, что у всех пациентов этой группы число интерферон- γ -продуцирующих клеток увеличивается поступательно от вакцинации до вакцинации.

Помимо противоопухолевого ответа Т-лимфоцитов на вакцинотерапию дендритными клетками, изучалась также неспецифическая активность клеток способных секретировать интерферон- γ в ответ на ФГА на фоне иммунизации (табл. 2). Статистически значимое увеличение числа данных клеток имеется у 7 пациентов (М.А.В., С.Н.М., П.А.В., Д.Ф.А., Г.С.Л.). Статистически значимое уменьшение хотя бы на каком-то этапе – у 4 больных (Б.А.В., П.Н.А., Г.С.Д., Т.О.В.). Полученные результаты свидетельствуют о повышении неспецифической активности Т-лимфоцитов в процессе вакцинации у большей части пациентов.

Была также установлена прямая взаимосвязь между изменением числа интерферон- γ -продуцирующих клеток в ответ на лизат и ФГА. У 4 больных с повышением иммунного ответа в опытной пробе увеличивается также и неспецифическая реакция на ФГА (М.А.В., С.Н.М., С.Л.В., Г.С.Л.) У 1 пациента при уменьшении числа клеток в опытной пробе уменьшается и число клеток при инкубации с ФГА. Исследование по использованию дендритноклеточной вакцины для иммунизации больных меланомой проводилось в рамках I фазы клинических испытаний. На основании полученных результатов можно дать заключение об иммунологической эффективности данной вакцины.

У некоторых больных число клеток, секретирующих интерферон- γ , в процессе вакцинации увеличивается примерно в 3, а у одного в 10 раз. В местах введения вакцины у больных развивается реакция ГЗТ, что свидетельствует о наличии специфических иммунных реакций, направленных против опухоли [28].

Вакцина на основе дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом, предназначена для активации эффекторного звена иммунитета для уничтожения опухоли. Идея создания данной вакцины основана на сведениях о взаимодействии клеток иммунной системы и антиген-презентации. Дендритная клетка представляет фрагмент антигена в комплексе с молекулами HLA-ABC и HLA-DR как Т-хелперам, так и Т-киллерам и запускает каскад реакций, направленных на уничтожение клеток-мишеней. Предполагается, что и презентация опухолевых пептидов в иммуногенном комплексе

будет способствовать специфической активации Т-лимфоцитов и в конечном счете ликвидации опухолевой массы [19; 24; 29].

Однако параллельное изменение уровня интерферон- γ -продуцирующих клеток в ответ на опухолевый лизат и ФГА указывает на то, что аутологичная дендритноклеточная вакцина неспецифически активирует иммунную систему.

Вероятно, манипуляция с дендритными клетками и их активация стимулирует иммунную систему, которая реагирует на любые встретившиеся антигены.

Заключение

Полученные результаты позволяют говорить о стимуляции Т-клеточного звена иммунитета у большинства пациентов получающих дендритноклеточную вакцину.

Таблица 1

Число ИНФ- γ -продуцирующих клеток больных, получающих дендритноклеточную вакцину на разных этапах вакцинации в ответ на опухолевый лизат

Больные	№ точки	Опухолевый лизат + клетки	Медиана
В.Е.В.	1	4,3 $\pm$ 2,5	4
	3	3,7 $\pm$ 0,6	4
	5	4 $\pm$ 5,1	1
Б.А.В.	1	7,7 $\pm$ 3,8	6
	3	8,3 $\pm$ 6,1	7
	5	22,7 $\pm$ 12,7	18
М.А.В.	1	3 $\pm$ 1	3
	3	9 $\pm$ 4,6 **	8
	10	27,7 $\pm$ 5 ***	27
С.Н.М.	1	13 $\pm$ 8	13
	5	25,7 $\pm$ 2,1	25
	10	41,3 $\pm$ 10,5 ***	41
С.Л.В.	1	4 $\pm$ 2,6	5
	5	14 $\pm$ 7 **	14
	10	42,7 $\pm$ 5,5 ***	43
П.А.В.	1	15 $\pm$ 1,7	16
	5	12,7 $\pm$ 2,1	12
Т.А.В.	1	58,3 $\pm$ 10,7	56
	3	74,7 $\pm$ 14,4	83
С.Р.В.	1	54,7 $\pm$ 6,5	55
	3	24,7 $\pm$ 8,5 ***	25
К.Е.С.	1	5,7 $\pm$ 0,6	6
	3	16 $\pm$ 9,5	11
П.Н.А.	1	86 $\pm$ 12,8 *	89
	3	18 $\pm$ 3,5 **	16
	5	49,3 $\pm$ 11,5 ***	49
Г.С.Д.	1	39 $\pm$ 17,6	46
	3	28 $\pm$ 2,6	29
Т.О.В.	1	9 $\pm$ 5,6	8
	3	21,7 $\pm$ 7,1	23
Д.Ф.А.	1	18,7 $\pm$ 5,5	16
	3	11,7 $\pm$ 6,1	13
Г.С.Л.	1	3,3 $\pm$ 2,5	3
	3	36 $\pm$ 7,9 ***	33

*статистическая достоверность между первой и последующей точкой;

**статистическая достоверность между промежуточной и последней точками;

***статистическая достоверность между первой и последней точками.

Таблица 2

Число ИНФ-γ-продуцирующих клеток больных, получающих дендритноклеточную вакцину на разных этапах вакцинации в ответ на ФГА

Больные	№ точки	ФГА + клетки	Медиана
В.Е.В.	1	176,3 ± 90,45	195
	3	186 ± 10	188
	5	243 ± 44,7	257
Б.А.В.	1	306,3 ± 6 *	307
	3	448,3 ± 9,7 **	446
	5	302 ± 2,7	301
М.А.В.	1	202,7 ± 21,5	201
	3	238,3 ± 10,7**	236
	10	439,7 ± 13,9 ***	436
С.Н.М.	1	35,7 ± 4,1 *	37
	5	354 ± 7,9 **	351
	10	423 ± 9,6 ***	419
С.Л.В.	1	137 ± 58,6 *	134
	5	368 ± 50,2	353
	10	432 ± 9,2 ***	434
П.А.В.	1	331 ± 13,7	334
	5	391,7 ± 28,9 ***	386
Т.А.В.	1	224,7 ± 30	241
	3	219,7 ± 19,5	211
С.Р.В.	1	463,7 ± 7,2	460
	3	453 ± 7,5	452
К.Е.С.	1	215 ± 33,6	212
	3	226,3 ± 40,6	230
П.Н.А.	1	485,7 ± 15 *	487
	3	335 ± 31,6 **	348
	5	445 ± 10,8 ***	442
Г.С.Д.	1	425,7 ± 19,5	417
	3	224,7 ± 7,8***	217
Т.О.В.	1	418 ± 19,9	429
	3	305 ± 16 ***	305
Д.Ф.А.	1	196 ± 18,5	206
	3	382 ± 44,8 ***	400
Г.С.Л.	1	118 ± 34,1	128
	3	400 ± 7,2 ***	402

*статистическая достоверность между первой и последующей точкой;

**статистическая достоверность между промежуточной и последней точками;

***статистическая достоверность между первой и последней точками.

Литература

1. Бажанов С.П., Олюшин В.Е., Улитин А.Ю. и др. Специфическая противоопухолевая иммунотерапия в комплексном лечении больных со злокачественными супратенториальными глиомами // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – 6. – С. 23–7.
2. Бармашов А.Е., Никитин К.Д., Михайлова И.Н. и др. Оценка специфического противоопухолевого иммунитета методом ELISPOT у больных, получающих вакцину «Мелавак» // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 37–40.
3. Барышников А.Ю. Биотерапия злокачественных новообразований: «Экспериментальная онкология на рубеже веков» / Под редакцией М.И.Давыдова, А.Ю.Барышникова. – М.: издательская группа РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, 2003. – С. 543–9.
4. Барышников А.Ю. Вакциноterapia: «Детская онкология (национальное руководство)» / Алиев М.Д., Поляков В.Г., Менткевич Г.Л., Маякова С.А. – М.: «Практическая медицина», 2012. – С. 251–61.
5. Барышников А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – № 3. – С. 127–30.
6. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – № 2. – С. 59.
7. Барышников А.Ю., Никитин К.Д., Никифорова А.Н., Рубцова М.В. Сравнительное исследование иммуногенности противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток и дендритом in vitro // Аллергология и иммунология. – 2009. – № 3. – С. 361–3.
8. Лукашина М.И., Алиев В.А., Смирнова А.В. Вакцинация больных колоректальным раком аутологичными дендритными клетками // Сборник тезисов. Дом ученых «Биотехнология и онкология», Санкт-Петербург 29–31 мая 2005. – С. 115.
9. Манина И.В., Перетолчина Н.М., Сапрыкина Н.С. и др. Доклинические исследования иммунотерапии меланомы кожи с помощью цельноклеточных противоопухолевых вакцин, секретирующих GM-CSF // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 14–9.
10. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф. и др. Патент на изобретение «клеточной линии Mel Kor». № 2287578. Российский патент, июнь 2006.

11. Михайлова И.Н., Барышников К.А., Бурова О.С. и др. Первая фаза клинических испытаний противоопухолевой геномодифицированной вакцины. Оценка иммунного статуса // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 51–4.
12. Михайлова И.Н., Бурова О.С., Лукашина М.И. и др. Вакциноterapia диссеминированной меланомы геномодифицированными клетками // Материалы 15-ой Международной конференции «СПИД, рак и общественное здоровье» 22–26 мая 2006. Русский журнал «СПИД, рак и общественное здоровье». – 2006. – № 2. – С. 25.
13. Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Барышников А.Ю. и др. Клинические испытания аутологичной вакцины на основе опухолевых клеток, модифицированных геном tag-7 // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 23–7.
14. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Клеточные линии меланомы // Материалы V Симпозиума «Биологические основы терапии онкологических заболеваний». Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2006. – № 4. – С. 15.
15. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
16. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Чкадуа Г.З. и др. Вакциноterapia метастатической меланомы с использованием дендритных клеток: клиническое исследование I/II фазы // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 39–43.
17. Шоу А.Б., Сергиенко Н.Ф., Ситников Н.В., Чкадуа Г.З. Предварительные результаты использования вакцин на основе аутологичных дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами in vitro, в лечении рака мочевого пузыря // Урология. – 2008. – № 5. – С. 54–7.
18. Avigan D., Rosenblatt J., Kufe D. Dendritic/tumor fusion cells as cancer vaccines// Semin Oncol. – 2012. – 39. – P. 287–95.
19. Bender A., Sapp M., Schuler G. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood // J. Immunol. Methods. – 1996. – 196. – P. 121–35.
20. Camarero J., Ruiz S. Cancer immunotherapy products: regulatory aspects in the European Union// Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2012. – 8. – P. 1–6.
21. Copier J., Dalglish A. Whole-cell vaccines: A failure or a success waiting to happen? // Curr Opin Mol Ther. – 2010. – 12. – P. 14–20.
22. Czerkinsky C., Nilsson L.-A., Nygren H. et al. A Solid-phase Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells // Journal of Immunological Methods. – 1983. – 65. – P. 109–21.
23. Dalglish A. Therapeutic cancer vaccines: why so few randomised phase III studies reflect the initial optimism of phase II studies // Vaccine. – 2011. – 29. – P. 8501–5.
24. Duperrier K., Eljaafari A., Dezutter-Dambuyant C. Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements // J. Immunol. Methods. – 2000. – 238. – P. 119–31.
25. Kudrin A. Overview of cancer vaccines: Considerations for development // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2012. – 8. – P. 1–19.
26. Mellman I., Coukos G., Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age // Nature. – 2011. – 480. – P. 480–9.
27. Oshita C., Takikawa M., Kume A. et al. Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: Phase II clinical trial // Oncol Rep. – 2012. – P. 1–8.
28. Ridolfi L., Petrini M., Fiammenghi L. et al. Dendritic cell-based vaccine in advanced melanoma: update of clinical outcome // Melanoma Research. – 2011. – 21. – P. 524–9.
29. Romani N., Reider D., Heuer M. Generation of mature dendritic cells from human blood – an improved method with special regard to clinical applicability // J. Immunol. Methods. – 1996. – 196. – P. 137–51.
30. Shanker A., Brooks A., Jacobsen K. et al. Antigen presented by tumors in vivo determines the nature of CD8+ T-cell cytotoxicity // Cancer Res. – 2009. – 69. – P. 6615–23.
31. Thurner B., Röder C., Dieckmann D. et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application // J Immunol Methods. – 1999. – 223. – P. 1–15.
32. Vergati M., Intrivici C., Huen N. et al. Strategies for Cancer Vaccine Development // J Biomed Biotechnol. – 2010. – 7. – P. 1–13.
33. Whiteside T., Zhao Y., Tsukishiro T. et al. Enzyme-linked immunospot, cytokine flow cytometry, and tetramers in the detection of T-cell responses to a dendritic cell-based multi-peptide vaccine in patients with melanoma // Clin. Cancer Res. – 2003. – 9. – P. 641–9.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 616.006.441-092.9:615.453.87

Д.А. Бодягин¹, Е.Б. Исакова¹, М.С. Гинс², В.М. Бухман³, И.М. Лученко³, М.Ю. Каган⁴, П.Ф. Кононков², В.К. Гинс²
**ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ АМАРАНТА
 НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ОПУХОЛИ МЫШЕЙ**

¹ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» РАМН, Москва

²Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИССОК) РАСХН, Московская область

³ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

⁴Лечебно-диагностический центр КМ-клиник, Москва

Контактная информация

Бухман Владимир Михайлович, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией фармакологии и токсикологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел.: +7 (499) 324-22-44

e-mail: bukhman@mail.ru

Статья поступила 11.04.2012, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

5-кратное введение через рот водного экстракта, приготовленного из БАД'а «Фиточай Амарантил» (ВЭА) сопровождается торможением роста солидной лимфомы P388 у мышей. ВЭА способен усилить противоопухолевый эффект, наблюдаемый при однократной инъекции мышам низкодозового циклофосфамида.

Ключевые слова: биологически активная добавка «Фиточай Амарантил», торможение роста опухоли, однократный низкодозовый циклофосфамид.

D.A. Bodyagin¹, E.B. Isakova¹, M.S. Gins², V.M. Bukhman³, I.M. Luchenko³, M.Yu. Kagan⁴, P.F. Kononkov², V.K. Gins²
**INFLUENCE OF A WATER EXTRACT FROM AMARANTH LEAVES
 ON GROWTH OF AN TRANSPLANTED TUMOR OF MICE**

¹FSBI «G.F. Gause Institute of New Antibiotics» RAMS, Moscow

²The All-Russian Scientific Research Institute of Selection and Seed-Growing of Vegetable Cultures of RAAS, Moscow Region

³FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow;

⁴The medical-diagnostic centre of Km-clinics, Moscow

Abstract

5-fold administration through the mouth of the water extract prepared from the BAA "Phytotea Amaranthyl" (WEA) is accompanied by inhibition of the growth of a solid P388 lymphoma in mice. WEA is able to enhance the antitumor effect observed after a single injection of mice with low-dose cyclophosphamide.

Key words: biologically active additive «Phytotea Amaranthyl», tumor growth inhibition, water extracts of an amaranth, a single low dose of cyclophosphamide.

Введение

Многие растения содержат большое число ингредиентов, способных проявлять противоопухолевую активность. Недавно в ВНИИССОК впервые созданы сорта амаранта овощного назначения, содержащие в листьях высококачественный растительный белок, витамины, алкалоид амарантин, микроэлементы. Изучение влияния амаранта на опухолевый рост актуально как для более полного понимания полезности питания с использованием этого овоща, так и для определения возможности использования его в качестве источника соединений, которые могут быть полезны для профилактики онкологических заболеваний и лечения онкологических пациентов. Такими средствами могут, в частности стать биологически активные добавки к пище, созданные на основе краснокрашного амаранта *Amaranthus tricolor* Linn. (*Amaranthus gangeticus* L.) семейство *Amaranthaceae*.

Известно, что, начиная с 4 тысячелетия до нашей эры, овощные виды амаранта широко используются для питания и в качестве лечебного средства в странах Латинской Америки, Юго-Восточной Азии, Индии, Китае [2]. *Amaranthus tricolor* Linn является одним из традиционных лекарственных растений, применяемых в народной медицине многих народов: растение широко приме-

няется для лечения меноррагии, диареи, дизентерии, геморрагического колита, кишечных кровоизлияний, кашля и бронхита, а также используется наружно в качестве смягчающих или припарок, для промывания рта, лечения изъязвлений горла и полости рта, язвенной болезни, обладает вяжущим действием [6; 7; 9]. Этанольный экстракт листьев *A. Tricolor* проявляет выраженную гепатопротекторную активность [5].

На основании многочисленных исследований нами показано, что листовая биомасса краснокрашного растений амаранта (*Amaranthus tricolor* L., селекции ВНИИССОК) содержит биологически активные вещества: краснофиолетовый пигмент амарантин (бетацианин), незаменимые аминокислоты, аскорбиновую кислоту, фенольные соединения, в том числе простые фенолы и фенолкарбоновые кислоты, оксикоричные кислоты, флавоноиды, конденсированные и полимерные полифенолы, пектин и др. [3]. Благодаря этим веществам, водные экстракты амаранта обладают бактерицидным и антимикотическим действием, влияют на устойчивость иммунной системы, стимулируют рост и развитие бифидо- и лактобактерий [4]. Водорастворимый гетерополисахарид изолирован из стеблей *A. Tricolor* [12]. Из этилацетатного экстракта листьев и семян *A. tricolor* были выделены галоктозилдиацилглицерины, с мощной активностью ингибиторов циклооксигеназ 1 и 2 и роста

опухолевых клеток. Эти соединения проявляют антипролиферативную активность в культурах клеток рака желудка (AGS), ЦНС (SF-268), толстой кишки (HCT-116), лёгкого (NCI-H460) и РМЖ (MCF-7) [8]. Добавление к диете 5, 7,5 и особенно 10 %-ного водного экстракта амаранта подавляет *in vitro* пролиферацию клеток рака печени (HepG2), РМЖ (MCF-7) и рака толстой кишки (CaCO-2), но не нормальных клеток (Chang Liver), а также *in vivo* химического гепатоканцерогенеза у крыс [11]. В связи с этим особый интерес представляет изучение противоопухолевого действия водного экстракта, полученного из БАД'а «Фиточай Амарантил», как одного, так и в сочетании с однократным введением циклофосфида в низкой дозе (антисупрессорная обработка [13]).

Материалы и методы

Животные

Самцов мышей линии DBA/2 (D2) и гибридов (C57BL/6 × DBA/2)F1 (B6D2F1) получали из питомника ПАМН «Крюково». Животных содержали при естественном режиме освещения, со свободным доступом к воде и пище.

Опухоль

Использовали перевиваемый лимфобластный лейкоз Р-388. Штамм поддерживали в асцитной форме серийными внутрибрюшинными пассажами на мышцах линии D2. В опытах опухоль перевивали гибридам B6D2F1 под кожу правого бока по 1×10^6 клеток на мышшь. День прививки опухоли принимали за 0.

Препараты

Водный экстракт БАД'а «Фиточай Амарантил» (ВЭА) получали путём 30-минутной экстракции в дистиллированной воде, соотношение растительного материала и воды 1 : 7. Затем проводили центрифугирование при 3 тыс. оборотах в мин. в течение 10 мин. Мышам вводили перорально надосадочную жидкость (по 0,5 мл / мышшь × 5 суток). Использовали также коммерческий циклофосфамид (ЦФ).

Эксперименты

Противоопухолевую активность проверяли, вводя ВЭА по 0,5 мл через рот 1 раз в сутки, ежедневно на протяжении 5 суток. Кроме влияния самого ВЭА изучали также комбинацию однократного низко-дозового (50 мг/кг в/бр) ЦФ с последующим введением ВЭА, схемы даны в разделе «Результаты и обсуждение». В динамике следили за темпом роста опухоли, измеряя штангенциркулем три наибольших взаимно перпендикулярных диаметра. Параметр ТРО рассчитывали по формуле:

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

$CPMO_k$ и $CPMO_o$ – средняя расчётная масса опухоли в контроле и опыте, соответственно.

Массу опухоли рассчитывали по формуле:

$$PMO(mg) = \frac{(a \times b \times c)}{2}, \text{ где}$$

PMO – расчётная масса опухоли, a , b , c – 3 наибольших взаимно перпендикулярных диаметра опухолевого узла в мм [10].

О токсичности судили по общему состоянию мышей и изменению массы тела за вычетом рассчитанной массы опухоли.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel 2003 и BioStat 2008 Professional. Достоверность различий средних определяли по *t*-критерию Стьюдента. Достоверность различий в продолжительности жизни определяли по непараметрическому критерию Колмогорова-Смирнова. За достоверные принимали различия при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Всего было поставлено 3 опыта по изучению противоопухолевой активности: в двух опытах использовали половозрелых мышей 2-3 месячного возраста и в одном эксперименте – более пожилых мышей в 5-месячном возрасте. В наших опытах ВЭА проявил активность на молодых животных и не проявил активности на пожилых животных (результаты не показаны).

Результаты опытов на молодых мышцах представлены на рис. 1–2 и в табл. 1; 2 и 3. Несмотря на то, что опухоль у мышей, не получавших лечения, развивалась одинаково в обоих опытах, терапевтические эффекты несколько отличались. В первом эксперименте ВЭА вводили с 3 по 7 сутки, а во втором – с 5 по 9 сутки. Если при более раннем начале лечения наблюдалось сильное торможение темпа развития узла на месте инокуляции опухолевых клеток вплоть до 17 суток (рис. 1, табл. 1), то при более позднем начале терапии сильное торможение роста опухоли быстро ослабло, хотя и оставалось статистически достоверным, к 18 суткам (рис. 2, табл. 1). Если при раннем начале терапии наблюдалось, хотя и слабое, но статистически достоверное увеличение выживаемости, то при более позднем начале терапии ВЭА не повлиял на выживаемость мышей (табл. 3). Таким образом, можно заключить, что ВЭА при пероральном введении способен проявить противоопухолевую активность, проявляющуюся достоверным ингибированием темпа роста опухоли.

Можно предположить, что одни компоненты, содержащиеся в ВЭА, способны непосредственно влиять на выживаемость опухолевых клеток [8; 11], а другие могут влиять на противоопухолевую резистентность организма [4; 12]. Одним из приёмов, позволяющих более эффективно влиять на противоопухолевую резистентность организма, является антисупрессорная обработка, в частности – путём однократного введения низко-дозового ЦФ [13]. Как видно из представленных результатов (рис. 1 и 2, табл. 1 и 3) такая обработка приводила, в наших опытах, к резкому торможению роста опухоли и достоверному увеличению выживаемости. Введение ВЭА на фоне обработки организма ЦФ сопровождалось значительным увеличением эффекта в первом опыте.

Следует отметить, что, по непонятной причине, одинаковая обработка ЦФ значительно сильнее затормозила развитие опухоли во втором опыте, по сравнению с первым. Во втором опыте введение одного ЦФ привело к практически полному предотвращению роста лимфомы на месте инокуляции клеток лимфобластного лейкоза вплоть до 18 суток (начало гибели мышей, не получавших препараты). Кроме того, начало терапии ВЭА во втором опыте было более поздним.

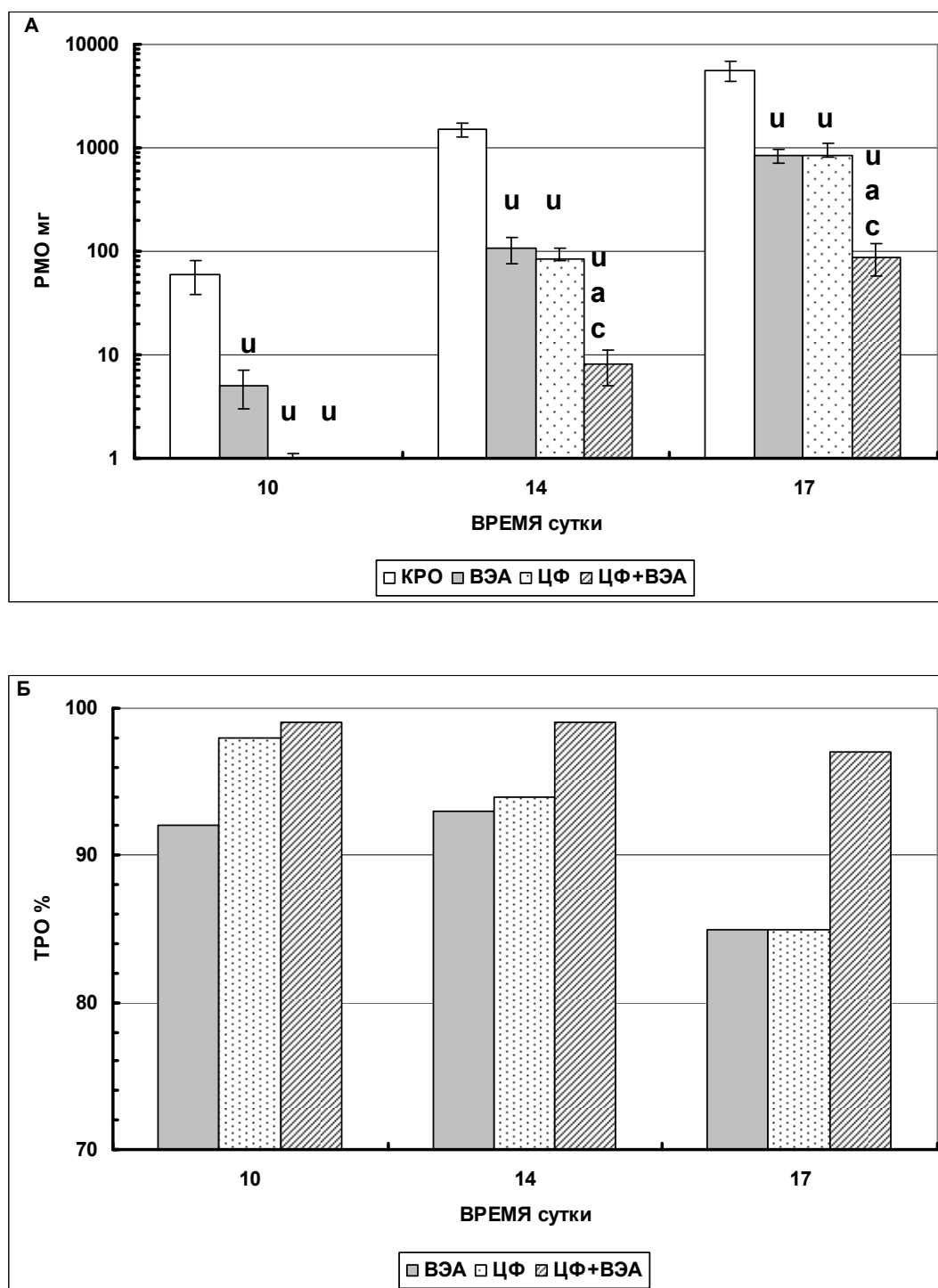


Рис. 1. Влияние ВЭА, ЦФ и комбинации «ЦФ + ВЭА» на темп роста подкожной лимфомы, развившейся из трансплантированных клеток лимфобластного лейкоза Р388 (опыт №1):

1А: данные представлены в виде среднего $\pm$ ст. ош.

КРО – контроль роста опухоли; ВЭА – водный экстракт амаранта; ЦФ – циклофосфамид. ЦФ вводили однократно в дозе 50 мг/кг в/бр в сутки 2. ВЭА вводили ежедневно по 0,5 мл через рот, с 3 по 7 сутки опыта. u, a, c – достоверное отличие по сравнению с группой КРО, ВЭА и ЦФ, соответственно.

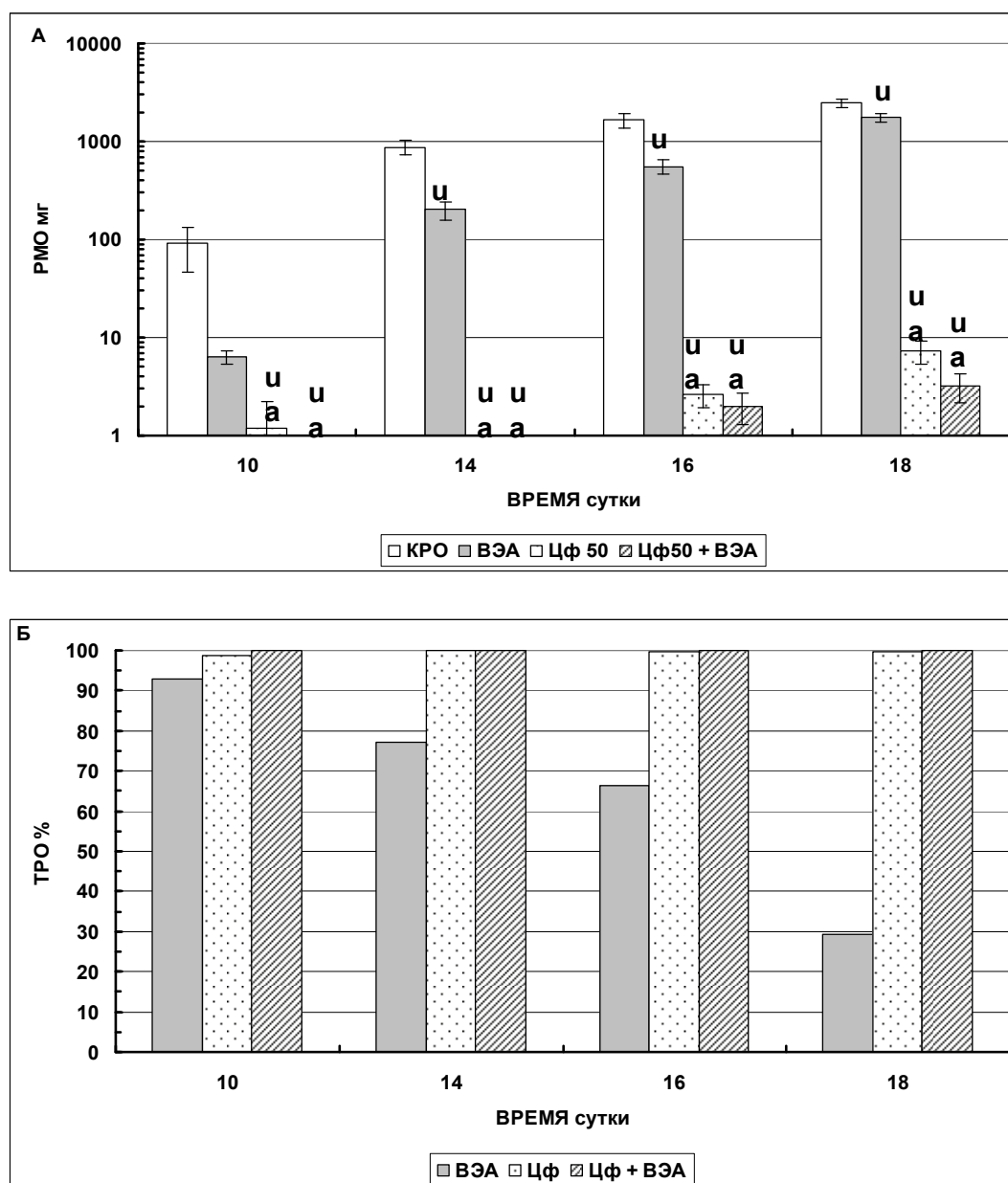


Рис. 2. Влияние ВЭА, ЦФ и комбинации ЦФ+ВЭА на темп роста подкожной лимфомы, развившейся из трансплантированных клеток лимфобластного лейкоза Р388 (опыт №2). ВЭА вводили ежедневно по 0,5 мл через рот, с 5 по 9 сутки опыта. Остальное – как на рис. 1.

Таблица 1
Влияние ВЭА, ЦФ и комбинации ЦФ+ВЭА на динамику роста солидной лимфомы, развившейся на месте подкожной трансплантации мышам клеток лимфобластного лейкоза Р388

РМО в мг (ТРО %) на сутки						
Группа	n	10	14	16	17	18
Опыт №1						
КРО	11	59 ± 21	1507 ± 242		5537 ± 1217	
ВЭА	7	5 ± 2 (92) ^u	106 ± 31 (93) ^u		828 ± 125 (85) ^u	
ЦФ	6	1 ± 0,1 (98) ^u	83 ± 24 (94) ^u		836 ± 254 (85) ^u	
ЦФ+ВЭА	7	0,1 ± 0,1 (99) ^u	8 ± 3 (99) ^{u,a,c}		88 ± 30 (97) ^{u,a,c}	
Опыт №2						
КРО	13	91 ± 44	875 ± 152	1653 ± 294		2468 ± 243
ВЭА	10	6 ± 1 (93) ^c	201 ± 44 (77) ^{u,c}	556 ± 96 (66) ^{u,c}		1745 ± 178 (29) ^{u,c}
ЦФ	10	1 ± 1 (99)	1 ± 0,2 (100) ^{u,a}	3 ± 1 (100) ^{u,a}		7 ± 2 (100) ^{u,a}
ЦФ+ВЭА	10	0 ± 0 (100) ^a	0,4 ± 0,2 (100) ^{u,a}	2 ± 1 (100) ^{u,a}		3 ± 1 (100) ^{u,a}
п – число животных в группе. Остальные сокращения, режим введения и дозы препаратов см. в подписях к рис. 1 и 2						

n – число животных в группе. Остальные сокращения, режим введения и дозы препаратов см. в подписях к рис. 1 и 2.

Таблица 2

Влияние ВЭА, ЦФ и комбинации ЦФ+ВЭА на изменение массы тела (без подкожной опухоли) мышей с трансплантированным лимфобластным лейкозом Р388

Группа	n	Изменение массы тела (без подкожной опухоли) в %:				
		10	14	16	17	18
Опыт №1						
КРО	11	105 ± 1	108 ± 2		100 ± 4*	
ВЭА	7	102 ± 2	108 ± 3		113 ± 3 ^u	
ЦФ	6	103 ± 1	105 ± 1		108 ± 2	
ЦФ+ВЭА	7	102 ± 3	107 ± 1		109 ± 1	
Опыт №2						
КРО	13	116 ± 2	116 ± 2	121 ± 2		118 ± 2
ВЭА	10	106 ± 1 ^u	109 ± 2 ^u	117 ± 2 ^c		116 ± 2
ЦФ	10	106 ± 2 ^u	106 ± 2 ^u	111 ± 2 ^u		111 ± 2 ^u
ЦФ+ВЭА	10	98 ± 3 ^{u,c,a}	98 ± 2 ^{u,c,a}	105 ± 2 ^{u,c,a}		106 ± 2 ^{u,a}

*4 из 11 мышей пали

Таблица 3

Влияние ВЭА, ЦФ и комбинации ЦФ+ВЭА на выживаемость мышей, которым трансплантировали под кожу клетки лимфобластного лейкоза Р388

№ оп	Группа	n	СПЖ	Сроки гибели	УПЖ
			сутки	сутки	%
1	КРО	11	19,4	16; 17; 17; 17; 18; 20; 20; 20; 20; 22; 26	
	ВЭА	7	22,3	20; 21; 21; 22; 22; 23; 27*	15
	ЦФ	6	22,8	22; 22; 23; 23; 23; 24*	18
	ЦФ + ВЭА	7	25,6	22; 23; 26; 27; 27; 27; 27*	32
2	КРО	13	21,9	17; 21; 21; 21; 21; 21; 22; 22; 23; 23; 24; 24; 25	
	ВЭА	10	21,4	21; 21; 21; 21; 21; 21; 21; 22; 22; 23	-2
	ЦФ	10	29,4	27; 27; 29; 29; 29; 29; 30; 30; 30; 34*	34
	ЦФ + ВЭА	10	30,1	25; 26; 27; 27; 30; 30; 32; 32; 35; 37*	37

*достоверное отличие от группы КРО.

Условия постановки опытов и сокращения см. в подписях к рис. 1 и 2.

Таким образом, ВЭА может быть более активен в случае предварительной антисупрессорной обработки ЦФ. Однако необходимо дальнейшее изучение, как для уточнения оптимальных условий комбинирования, так и для расшифровки механизмов, лежащих в основе усиления противоопухолевого эффекта.

На протяжении всего срока наблюдения не наблюдалось проявлений токсичности использованных препаратов. Введение ВЭА не вызывало похудания мышей (табл. 2). Наблюдающиеся небольшие различия, хотя статистически достоверные, скорее всего, связаны с влиянием на распространение лейкозного процесса.

Таким образом, ВЭА проявил при ежедневном пероральном введении достоверную противоопухолевую активность. Механизм противоопухолевой активности ВЭА требует специального изучения: он может определяться как прямым, так и опосредованным действием входящих в состав ВЭА компонентов.

При этом очень важно отметить, что изученный нами ВЭА (полученный из БАД'а) не стимулирует рост опухоли. ВЭА помимо антиоксиданта амарантина содержит в большом количестве полифенолы, в том числе флаваноиды, кверцетин, дегидрокверцетин, рутин, которые также обладают противоопухолевым действием [4].

Литература

1. Гинс М.С., Бодягин Д.А., Кононков П.Ф., Исакова Е.А., Гинс В.К., Бухман В.А. Патент РФ № 2377008 от 27.10.2009.
2. Кононков П.Ф., Гинс В.К., Гинс М.С. Амарант – перспективная культура XXI века. – М.:РУДН, 1999. – 298 с.
3. Гинс М.С. Биологически активные вещества амаранта: Амарантин: свойства, механизмы действия и практическое использование. – М.:РУДН, 2002. – 183 с.

Можно предположить, что использование в диетах онкологических пациентов амаранта и БАД'а «Фиточай Амарантил» полезно, а ВЭА является перспективным препаратом для комбинированной химиотерапии опухоли. В связи с вышесказанным представляются перспективными дальнейшие клинко-лабораторные исследования ВЭА с целью рекомендации их для использования в терапии онкологических пациентов. По результатам исследований получен патент РФ [1].

Выводы

1. Водный экстракт, приготовленный из БАД к пище «Фиточай Амарантил», не токсичен и не стимулирует роста опухоли у экспериментальных животных.
2. Водный экстракт, приготовленный из БАД к пище «Фиточай Амарантил», обладает противоопухолевой активностью: торможение роста опухоли выявлено в отношении роста трансплантированного под кожу мышам лимфобластного лейкоза Р-388.
3. Сочетанное применение водного экстракта, приготовленного из БАД к пище «Фиточай Амарантил», с однократной инъекцией низкодозового циклофосфамида может сопровождаться увеличением противоопухолевого эффекта.

4. Кононков П.Ф., Пивоваров В.Ф., Гинс М.С., Гинс В.К. Интродукция и селекция овощных культур для создания нового поколения продуктов функционального действия. – М.:РУДН, 2008. – 170 с.
5. Al-Dosari M.S. The effectiveness of ethanolic extract of *Amaranthus tricolor* L.: A natural hepatoprotective agent // *Am J Chin Med.* – 2010. – 38(6). – P. 1051–64.
6. Devaraj V.C, Krishna B.G. Gastric antisecretory and cytoprotective effects of leaf extracts of *Amaranthus tricolor* Linn. in rats // *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* – 2011. – 9(9). – P. 1031–8.
7. Hussain Z., Amresh G., Singh S., Rao C.V. Antidiarrheal and antiulcer activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals // *Pharm Biol.* – 2009. – 47(10). – P. 932–9.
8. Jayaprakasam B., Zhang Y., Nair M.G. Tumor cell proliferation and cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds in *Amaranthus tricolor* // *J Agric Food Chem.* – 2004. – 52(23) – P. 6939–43.
9. Jayaraj A.P., Tovey F.I., Clark C.G. Possible dietary protective factors in relation to the distribution of duodenal ulcer in India and Bangladesh // *Gut.* – 1980. – 21(12). – P. 1068–76.
10. Pacor S., Giacomello E., Bergamo A. et al. Antimetastatic action and lymphocyte activation by the modified lysozyme mpeg-lyso in mice with mca mammary carcinoma // *Anticancer Res.* – 1996. – 16(5A). – P. 2559–64.
11. Sani H.A., Rahmat A., Ismail M. et al. Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangeticus*) extract // *Asia Pac J Clin Nutr.* – 2004. – 13(4). – P. 396–400.
12. Sarkar R., Nandan C.K., Mandal S. et al. Structural characterization of a heteropolysaccharide isolated from hot water extract of the stems of *Amaranthus tricolor* Linn. (*Amaranthus gangeticus* L.) // *Carbohydr Res.* – 2009. – 344(17). – P. 2412–6.
13. Ben-Efraim S. Immunomodulating anticancer alkylating drugs: Targets and mechanisms of activity // *Current Drug Targets.* – 2001. – 2(2). – P. 197–212.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616-006.3.04-092.9:615.277.3

Т.Л. Юркитович¹, П.М. Бычковский¹, Н.В. Голуб¹, В.А. Алиновская¹, Р.И. Костерова¹, А.А. Кладиев²,
С.А. Красный³, Ю.П. Истомин³, Е.Н. Александрова³, М.Ю. Ревтович³, А.И. Шмак³

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ПРОСПИДИНА IN VIVO НА МОДЕЛЯХ САРКОМЫ М-1 И САРКОМЫ ЙЕНСЕНА

¹ Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск

² ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва

³ РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, пос. Лесной, Минская область

Контактная информация

Наталья Васильевна Голуб, старший научный сотрудник лаборатории лекарственных средств на основе модифицированных полисахаридов

адрес: 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14; тел/факс +7(10)-(375)-17-209-55-86

e-mail: natali.golub@tut.by

Статья поступила 21.09.2011, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

Изучено влияние иммобилизованной формы проспицина на рост подкожно перевитых опухолей саркомы М-1 и Йенсена в сравнении с раствором субстанции проспицина, полимером-носителем. Показано, что иммобилизованная форма проспицина обеспечивает повышение эффекта противоопухолевой активности по сравнению с раствором проспицина с такой же дозой активного вещества, излечение животных наблюдали в 100 % случаев.

Ключевые слова: иммобилизованная форма, проспидин, фосфат декстрана, саркома М-1 крыс, саркома Йенсена крыс.

T.L. Yurkshtovich¹, P.M. Bychkovsky¹, N.V. Golub¹, V.A. Alinovskaya¹, R.I. Kosterova¹, A.A. Kladiev², S.A. Krasny³,
Yu. P. Istomin³, E.N. Alexandrova³, M.Yu. Revtovich³, A.I. Shmak³

IN VIVO ANTINEOPLASTIC EFFECT OF POLYMER-IMMOBILIZED PROSPIDIN ON RAT M-1 SARCOMA AND RAT JENSEN SARCOMA USED AS A MODELS

¹ Belorussian State University, Research Institute for physical Chemical Problem, Minsk

² Biotechcompany TNK, Moscow

³ N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Minsk

Abstract

The effect of prospidin in immobilized form on growth of subcutaneously implanted M-1 sarcoma and Jensen sarcoma was studied in comparison with prospidin solution and polymer carrier (dextran phosphate). It was shown that immobilized prospidin form provides an increase of antitumor activity effect in comparison with prospidin solution with the same dose of active substance and results in animal recovery in 100% of cases.

Key words: prospidin hydrogel, dextran phosphate, rat M-1 sarcoma, rat Jensen sarcoma.

Введение

Отечественный противоопухолевый препарат проспидин [дихлорид N,N³-ди(γ-хлор-β-оксипропил)-N¹, N²-дипиротриниперазиния] используется в медицинской практике при лечении рака гортани, кожных ретикулезов, рака мочевого пузыря и других видов злокачественных новообразований [1; 2]. Он характеризуется хорошей переносимостью больными, большим диапазоном доз, при которых проявляется терапевтическое действие препарата без побочных явлений. Однако, биологическая доступность проспицина при внутривенном введении ограничена быстрым исчезновением препарата или продуктов его трансформации из крови, что препятствует достижению максимального лечебного действия [2]. В связи с этим, возможность получения пролонгированной формы проспицина, способной поддерживать действующую концентрацию цитостатика в крови в течение длительного времени, является важной и актуальной задачей. Одним из эффективных решений этой проблемы является химическая модификация проспицина путем присоединения его к нетоксичным полимерам, способным к биодеструкции. Сведения о по-

лучении пролонгированных форм проспицина, которые могут найти применение для локальной терапии различных патологических процессов, в литературе отсутствуют.

Данная работа посвящена получению иммобилизованной формы проспицина и изучению ее противоопухолевой активности на моделях саркомы М-1 и саркомы Йенсена. В качестве полимера-носителя для иммобилизации проспицина был использован фосфат декстрана, который относится к классу малотоксичных веществ, обладает иммуномодулирующей активностью, способностью к биodeградации и может быть получен в виде микрогелей.

Материалы и методы

Объекты и реактивы

В качестве исходных материалов и реактивов в работе использовали: декстран с молекулярной массой 60000 Да (НД № РБ 0221С-2008), ортофосфорную кислоту (ГОСТ 6552-80, $\rho_{40}^{20} = 1,698$ г/мл; с = 85,4 %), мочевины (х.ч.), гидроксид натрия, соляную кислоту, азотную кислоту, серную кислоту, перекись водорода, молибдат аммония, ванадат натрия, муравьиную кислоту, уксусный

ангидрид, хлорную кислоту, кристаллический фиолетовый (все реагенты с маркой «чда»), субстанцию проспицина (ФСП 1501 – 10).

Приборы

ИК-спектрофотометр Thermo Nicolet FT-IR Nexus, спектрофотометр UV VIS PB 2201, аппарат для определения азота, рН-метр HI 9321, газовый хроматограф Agilent 7890A с двумя детекторами FID и MSD.

Получение

иммобилизованной формы проспицина

Для получения иммобилизованной формы проспицина (ПР) в качестве полимера-носителя использовали фосфат декстрана (ФД) с содержанием фосфорнокислых групп 2,2 ммоль/г, образующий при набухании в воде (степень набухания 160 г/г) суспензию микрогелей, проходящую через иглу шприца (2 мл). Синтез ФД осуществляли проведением реакции этерификации декстрана ортофосфорной кислотой в присутствии мочевины в течение 3 ч при массовом соотношении декстран: H_3PO_4 : $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ = 1 : 0,44 : 1,49, температуре 125 °С и остаточном давлении в зоне реакции $\leq 0,2$ атм [3].

Образцы иммобилизованной формы проспицина с соотношением ФД : ПР = 1 : 1 (ФД₍₁₎ – ПР) и 2 : 1 (ФД₍₂₎ – ПР) синтезировали путем набухания ФД в водных растворах цитостатика с заданными концентрациями и последующего лиофильного высушивания. Полученные образцы стерилизовали радиационным методом (доза 2,5 Мрад).

О химическом взаимодействии проспицина с ФД свидетельствуют данные ИК-спектроскопии: в ИК-спектрах иммобилизованных форм проспицина по сравнению с ИК-спектром аддитивной смеси ФД и проспицина отсутствует полоса поглощения при 2360 см^{-1} (валентные колебания гидроксильных фосфорнокислых групп, ассоциированных водородными связями) и уменьшается интенсивность полос поглощения при 2980, 2900 и 2847 см^{-1} (валентные колебания C-H в группах CH, CH₂, CH₂Cl проспицина).

Отмеченные изменения в ИК-спектрах, а также данные рН-метрии свидетельствуют об электростатических и донорно-акцепторных связях проспицина и ФД.

Кроме того, нельзя исключить и наличие свободных не связанных с полимером молекул проспицина, которые при набухании препарата в воде распределены в пространственной сетке образовавшегося геля. Разделение свободной, растворенной в воде гидрогеля, и полимер-связанной фракций проспицина в набухших препаратах, в работе не проводили. Однако, сопоставление содержания фосфорнокислых групп в ФД и соотношения полимер: цитостатик показывает, что доля свободных молекул проспицина выше в препарате ФД₍₁₎ – ПР.

Исследование

противоопухолевой активности

иммобилизованной формы проспицина in vivo

Исследования проведены на 120 белых беспородных крысах обоего пола (80 крыс с саркомой М-1 и 40 крыс с саркомой Йенсена), полученных из вивария РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова. Животные находились на стандартной диете и в обычном питьевом режиме.

Использовали два штамма перевиваемых опухолей крыс: саркому М-1, полученную из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН (Москва) и саркому Йенсена, полу-

ченную из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) [4], которые поддерживали путем перевивки животным каждые 2 недели. Для экспериментов крысам с массой тела 120–160 г перевивали опухоли подкожно в область левого бедра, вводя по 0,5 мл 20 %-ной взвеси опухолевой ткани.

Эксперименты проводили на 7–10 сутки после перевивки опухоли крысам. В каждой контрольной и опытной группах использовали по 8–10 крыс.

Перед применением к препаратам ФД₍₁₎ – ПР и ФД₍₂₎ – ПР добавляли по 10 мл стерильной воды и выдерживали для набухания и образования суспензии набухших микрогелей.

Полученные суспензии вводили крысам однократно внутривенно в объемах 1 или 2 мл на 100 г массы тела так, чтобы дозы препаратов составляли от 1000 до 3000 мг/кг массы животного. Дозы препаратов и составляющих их компонентов, а также результаты оценки эффективности противоопухолевого действия приведены в таблицах 1, 2 и на рисунках 1 – 3.

Использовали следующие критерии оценки противоопухолевой эффективности:

- динамика роста опухоли: для этого 3 раза в неделю проводили измерения размеров опухолей в контрольных и опытных группах с последующим построением кривых роста;
- объем опухоли (V , см^3) рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{(a \times b \times c) \pi}{6}, \text{ где}$$

a , b и c – линейные размеры опухоли в см; индекс роста опухоли (ИРО) [1]:

$$\text{ИРО, \%} = \left(\frac{S_o}{S_k} \right) 100\%, \text{ где}$$

S_o и S_k – площади под кинетической кривой роста опухолей в опытной и контрольной группах животных;

- средняя продолжительность жизни (СПЖ) павших животных;
- число излеченных животных: излеченными считали выживших через 60 дней после лечения животных, у которых опухоль не пальпировалась.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя программу Origin 7 (2002 год).

Результаты

Изучение противоопухолевой активности на штамме саркомы М-1

Результаты, представленные на рис. 1 и 2 и в табл. 1, свидетельствуют, что проспицин и его иммобилизованные формы: ФД₍₁₎ – ПР и ФД₍₂₎ – ПР, а также и сам ФД вызывали торможение роста опухоли у крыс с перевитой саркомой М-1 (Са М-1) по сравнению с контролем.

Динамика изменения объемов опухолей в течение 40 дней наблюдения показывает, что наиболее выраженное противоопухолевое действие оказывал препарат ФД₍₁₎ – ПР в дозе 2000 мг/кг, что эквивалентно вводимым дозам проспицина и ФД по 1000 мг/кг веса животного (рис. 1; 2).

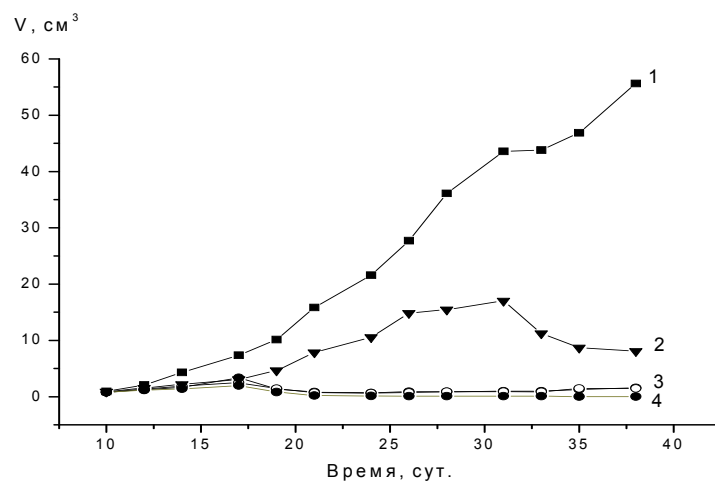


Рис. 1. Динамика роста Са М-1 крыс в контроле (1) и после однократного внутрибрюшинного введения ФД (2) в дозе 2000 мг/кг, субстанции ПР (3) в дозе 1000 мг/кг и ФД₍₁₎ – ПР (4) в дозе 2000 мг/кг.

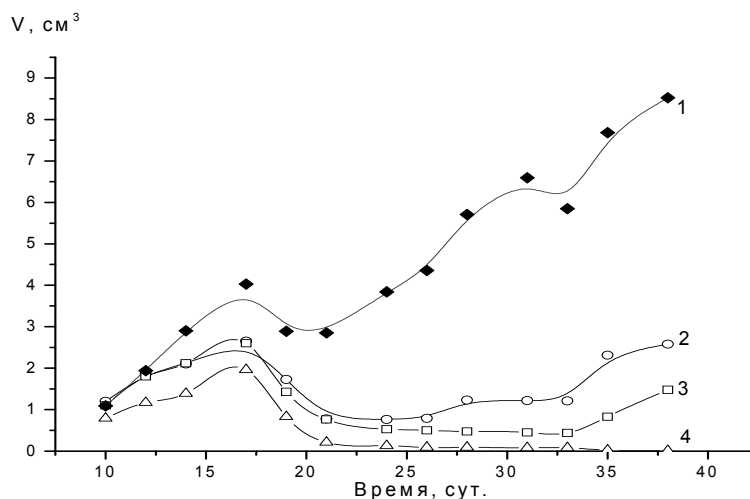


Рис. 2. Динамика роста Са М-1 крыс после однократного внутрибрюшинного введения препаратов ФД₍₁₎ – ПР (1, 4) и ФД₍₂₎ – ПР (2, 3) в дозах в пересчете на проспидин 500 (1, 2) и 1000 (3, 4) мг/кг.

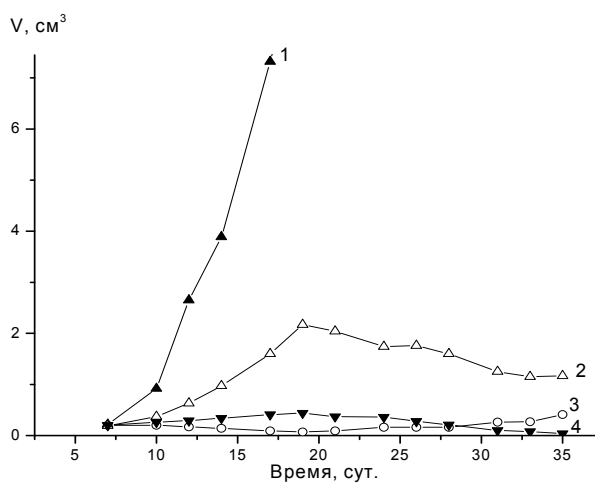


Рис. 3. Динамика роста саркомы Йенсена крыс в контроле (1) и после однократного внутрибрюшинного введения препаратов: 2 – ФД в дозе 1000 мг/кг, 3 – субстанция ПР в дозе 1000 мг/кг, 4 – ФД₍₁₎ – ПР в дозе 2000 мг/кг (эквивалентно 1000 мг/кг проспидина).

Таблица 1

Влияние исследуемых препаратов на ИРО, СПЖ и число излеченных животных с саркомой М-1

Группа	доза, мг/кг	доза компонента, мг/кг		S под кривой роста опухоли, см ² × с.	ИРО, %	СПЖ, с.	Излеченные животные, %
		ПР	ФД				
1	—	—	—	690,91±55,62	100	31,5±2,24	0
2	2000	—	2000	239,75±17,01	34,70	40,0±7,25	0
3	500	500	—	36,14±3,37	5,23	65,5±9,40*	50
4	1000	1000	—	34,18±2,50	4,95	62,8±4,97*	50
5	1000	500	500	127,95±8,52	18,52	60,1±8,90*	0
6	2000	1000	1000	14,85±1,96	2,15	>60	100
7	1500	500	1000	43,85±2,65	6,35	>60	100
8	3000	1000	2000	31,06±2,60	4,50	67,6±2,66*	50
* достоверные различия с контролем (p<0,05); число крыс в каждой группе — 8.				Группа: 1 — контроль, 2 — ФД, 3-4 — ПР, 5-8 — ФД-ПР			

Таблица 2

Влияние исследуемых препаратов на ИРО, СПЖ и число излеченных животных с саркомой Йенсена

Группа	доза, мг/кг	доза компонента, мг/кг		S под кривой роста опухоли, см ² × с.	ИРО, %	СПЖ, с.	Излеченные животные, %
		ПР	ФД				
1	—	—	—	353,45±31,91	100	30,5±2,52	0
2	1000	—	1000	36,80±2,17*	10,41	37,4±7,25	10
4	1000	1000	—	7,65±0,44*	4,95	62,8±2,96*	50
6	2000	1000	1000	4,80±0,41*	1,36	>60	100
* достоверные различия с контролем (p<0,05); число крыс в каждой группе — 10.				Группа: 1 — контроль, 2 — ФД, 4 — ПР, 6 — ФД ₍₁₎ -ПР			

Площадь под кривой роста опухоли Са М-1 после введения крысам препарата ФД₍₁₎ — ПР в дозе, эквивалентной 1000 мг/кг проспирина, статистически достоверно меньше, чем при введении такой же дозы чистой субстанции цитостатика — 14,85±1,96 и 34±2,50 см²×сутки (табл. 1). Препарат ФД₍₁₎ — ПР в указанной дозировке вызывал статистически достоверное торможение роста Са М-1 во все сроки наблюдения, а начиная с 28 суток после перевивки, процент торможения опухоли достигал 100 %. Наименее выраженным противоопухолевым действием обладал ФД, для которого на 28 сутки наблюдения за животными процент торможения опухоли равнялся 57 %.

Противоопухолевые эффекты исследуемых препаратов оценивались и по показателю ИРО, который, согласно [5], учитывает не только величину, но и продолжительность противоопухолевого действия (чем меньше ИРО, тем продолжительнее и сильнее противоопухолевый эффект).

По эффективности противоопухолевого действия, оцениваемой по показателю ИРО (табл. 1), изученные препараты, вводимые животным-опухоленосителям в дозах, эквивалентных 500 и 1000 мг/кг проспирина, можно расположить в следующих последовательностях:

ФД₍₁₎ — ПР < ФД₍₂₎ — ПР < ПР (для дозы 500 мг/кг) и ПР < ФД₍₂₎ — ПР < ФД₍₁₎ — ПР (для дозы 1000 мг/кг).

Сравнение этих двух последовательностей позволяет сделать предположение о том, что при одинаковой дозе активного вещества существенное влияние на выраженность противоопухолевого действия оказывает количество содержащегося в препарате ФД.

Так, при введении крысам препаратов ФД₍₁₎ — ПР и ФД₍₂₎ — ПР в дозах, эквивалентных 1000 мг/кг проспирина (№ 6 и 8 в табл. 1), противоопухолевый эффект препарата ФД₍₁₎ — ПР был выше по сравнению с эффектом препарата ФД₍₂₎ — ПР, со-

державшего в два раза больше ФД (ИРО составляют 2,15 и 4,65 соответственно). Причиной такого влияния ФД в препарате может быть увеличение доли свободных не связанных с функциональными группами полимера молекул проспирина, распределенных в пространственной сетке набухшего геля ФД и характеризующихся значительно более высокой скоростью поступления в окружающую ткань организма животных. Это позволяет в более ранние сроки достигать эффективных концентраций цитостатика в опухоли и затем постоянно поддерживать их за счет более медленного высвобождения, связанного с функциональными группами проспирина, протекающего за счет обменных и биодеструктивных процессов. Кроме того, необходимо отметить, что приготавливаемые непосредственно перед применением суспензии с различными концентрациями по полимерному компоненту (ФД), имеют, соответственно, и различную консистенцию: если микрогели препарата ФД₍₂₎ — ПР занимают практически весь объем суспензии, то в случае ФД₍₁₎ — ПР наблюдается ее расслоение. Это не влияет на эффективность препарата ФД₍₁₎ — ПР при его внутрибрюшинном введении в дозе, эквивалентной 1000 мг/кг проспирина, но может являться причиной аномально низкой противоопухолевой активности (ИРО=18,52) при уменьшении дозы в два раза (500 мг/кг проспирина).

Для препарата ФД₍₁₎ — ПР и субстанции ПР, вводимых в дозе, эквивалентной 1000 мг/кг цитостатика, в начальный период времени (до 22 суток после перевивки) тенденция торможения объема опухоли одинакова. Далее в случае введения субстанции наблюдается рост объема опухоли, а в случае введения препарата ФД₍₁₎ — ПР рецидивный рост опухоли отсутствует. Это свидетельствует о более длительном противоопухолевом эффекте иммобилизованной формы проспирина по сравнению с субстанцией.

Подтверждением достижения пролонгации действия цитостатика при иммобилизации его на ФД являются полученные нами данные по исследованию фармакокинетики меченых ^{14}C проспирина и препарата ФД₍₁₎ – ПР при их однократном внутрибрюшинном введении крысам в одинаковых дозах в пересчете на активное вещество: для проспирина и препарата ФД₍₁₎ – ПР значения периода полувыведения ($T_{1/2}$) составляли 0,25 и 25,09 ч, соответственно (по результатам изучения фармакокинетики иммобилизованных форм проспирина при различных путях поступления препаратов в организм животных готовится отдельная статья).

Из результатов, приведенных в табл. 1, видно, что в группах животных, где для противоопухолевой терапии использовались препараты иммобилизованной формы проспирина (гр. 6 и 7, табл. 1), у всех животных через 60 дней после лечения опухоль не пальпировалась, т.е. число излеченных животных достигало 100 %.

Этот показатель был в два раза выше по сравнению с таковым для животных тех групп, в которых в качестве средства противоопухолевой терапии использовался проспирин.

Тем не менее, во всех группах наблюдалось статистически достоверное увеличение средней продолжительности жизни по сравнению с контролем.

Таким образом, на модели опухоли Са М-1 наиболее эффективным оказался препарат ФД(1) – ПР, вводимый однократно внутрибрюшинно в дозе 2000 мг/кг (эквивалентно дозе цитостатика 1000 мг/кг).

Литература

1. Деев В.Б., Сингин Ф.С., Королев Г.К. и др. Синтез и особенности распределения проспирина- ^{14}C , меченого по диспиротрипиперазину // Хим.-фарм. ж. – 1980. – Т. 14, № 1. – С. 7–10.
2. Чернов В.А., Богомолова Н.С., Минакова С.М. и др. Фармакокинетика проспирина у крыс. Сборник научных трудов Всесоюзного науч.-исслед. Химико-фармац. Института, «Фармакокинетика и метаболизм лекарственных препаратов». – Москва, 1978. Вып. 7. – С. 23 – 46.
3. Юркинович Т.Л., Кладиев А.А., Голуб Н.В. и др. Гидрогелевый противоопухолевый препарат. Пат. РФ № 14762.
4. Каталог Российской коллекции клеточных культур. – СПб, 2004. – С. 315.
5. Стуков А.Н., Иванова М.А., А.К. Никитин и др. Индекс роста опухоли как интегральный критерий эффективности противоопухолевой терапии в эксперименте // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47, № 5. – С. 616 – 618.

Изучение противоопухолевой активности на штамме саркомы Йенсена крыс

Результаты сравнительного исследования противоопухолевой активности субстанции ПР, ФД и препарата ФД₍₁₎ – ПР при однократном внутрибрюшинном введении крысам с перевитой саркомой Йенсена приведены на рис. 3 и в табл. 2. Видно, что, как и в случае саркомы М-1, наиболее выраженным противоопухолевым эффектом обладает препарат ФД₍₁₎ – ПР. Так, площади под кривой роста опухоли и значения ИРО после однократного внутрибрюшинного введения крысам с перевитой саркомой Йенсена препарата ФД₍₁₎ – ПР были статистически достоверно меньше, чем при введении субстанции проспирина. Однократное внутрибрюшинное введение субстанции проспирина в дозе 1000 мг/кг крысам с перевитой саркомой Йенсена достоверно увеличивало СПЖ по сравнению с контролем и ФД, при этом у 50 % животных через 60 суток после лечения опухоль не пальпировалась, т.е. они считались излеченными. При введении препарата ФД₍₁₎ – ПР излеченными были все животные.

Заключение

Препарат ФД₍₁₎ – ПР, представляющий собой иммобилизованный на фосфате декстрана проспирин с соотношением компонентов 1 : 1, при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 2000 мг/кг крысам с перевитыми саркомой М-1 и саркомой Йенсена (эквивалентно 1000 мг/кг субстанции проспирина), обеспечивает значительное повышение эффективности противоопухолевой активности по сравнению с субстанцией проспирина.

УДК 618.146-006.6:615.849:615.322

С.В. Корепанов¹, Т.Г. Опенко², Н.Д. Веряскина¹**СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ДИКОРАСТУЩИМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ ВО ВРЕМЯ РАДИАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ**¹Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Барнаул, Россия²НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск, Россия**Контактная информация**

Опенко Татьяна Геннадьевна – научный сотрудник лаборатории клинко-популяционных и профилактических исследований хронических неинфекционных и эндокринных заболеваний НИИ терапии СО РАМН

адрес: 630089, Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1; тел.: +7(953)769-56-59

e-mail: nsk217@rambler.ru

Статья поступила 25.10. 2011, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

Основной метод лечения рака шейки матки, радиационная терапия, часто приводит к лучевому повреждению окружающих тканей и ухудшению показателей периферической крови. Использование во время лучевого лечения экстрактов дикорастущих лекарственных трав, которые проявляют антибактериальное, противовоспалительное, иммуномодулирующее, противоопухолевое, мочегонное действие, позволяет уменьшить эти явления. Авторы рекомендуют комплексное применение лекарственных растений (элеутерококк колючий, *Eleutherococcus senticosus Maxim.*, бадан толстолистный, *Bergenia crassifolia*, береза повислая, *Betula Pendula*, ромашка аптечная, *Matricaria chamomilla L.*, подорожник большой, *Plantago major*, зверобой продырявленный, *Hypericum perforatum*, солодка голая, *Glycyrrhiza uralensis Fisch./Gl. Glabra*, толокнянка обыкновенная *Arctostaphylos uva-ursi Spr.*, тысячелистник обыкновенный *Achillea millefolium*) для уменьшения побочных эффектов лучевой терапии.

Ключевые слова: радиационная терапия, рак шейки матки, лекарственные растения.С.В. Korepanov¹, Т.Г. Openko², N.D. Veryaskina¹**WILD-GROWING HERBS ACCOMPANYING TREATMENT AT CANCER CERVIX UTERI IN RADIOTHERAPY**¹Altay branche of FSBI N.N. Blokhin RCRC of RAMS, Barnaul²Institute of Internal Medicine of RAMS, Novosibirsk**Abstract**

The primary method of treatment for cervical cancer, radiation therapy, often leads to radiation damage to surrounding tissue and deterioration of peripheral blood. Use during radiation treatment of wild herbs extracts that exhibit antibacterial, antiinflammatory, immunomodulatory, antineoplastic, diuretic effect, can reduce these effects. The authors recommend the combined use of medicinal plants (*Eleutherococcus senticosus Maxim.*, *Bergenia crassifolia*, *Betula Pendula*, *Matricaria chamomilla L.*, *Plantago major*, *Hypericum perforatum*, *Glycyrrhiza uralensis Fisch./Gl. glabra*, *Arctostaphylos uva-ursi Spr.*, *Achillea millefolium*) to reduce the side effects of radiotherapy.

Key words: radiotherapy, cancer cervix uteri, herbs.**Введение**

Рак шейки матки вносит 5,3% в структуру онкологической заболеваемости женского населения России, что составляет 14,7 тысяч человек или 19,3 на 100 000 женщин [2]. Основной метод лечения рака шейки матки (РШМ) – лучевой. Это «золотой стандарт» при локализованных процессах и единственный метод радикального лечения при местно распространенном и инвазивном раке. Увеличение дозы облучения увеличивает как радикальность лечения, так и частоту лучевых повреждений, из которых чаще всего наблюдаются таковые кожи, кишечника и нижних мочевыводящих путей, что может приводить к необходимости досрочного прерывания терапии. Поэтому поиск и введение в практику методов профилактики лучевых повреждений является сегодня актуальной задачей.

Использование сборов лекарственных растений для профилактики и смягчения побочных явлений лучевого лечения может дать неплохие результаты, если использовать по назначению хорошо изученные травы с известными свойствами. А

практика показывает, что очень часто онкологические пациенты самостоятельно принимают различные препараты, иногда опасные, из арсенала народной медицины, втайне от врача, рискуя причинить себе вред. Поэтому включение фитотерапии в сопроводительное лечение злокачественного новообразования является полезным не только с точки зрения непосредственной пользы (даже если она небольшая) лекарственных трав, но и увеличения степени доверия между врачом и пациентом и участия пациента в лечебном процессе (приготовление отваров, выполнение процедур), что повышает его эмоциональный фон и опосредованно усиливает сопротивляемость организма.

В онкологической практике целесообразно применение элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus Maxim.*). Гликозиды элеутерококка усиливают неспецифический иммунитет и сопротивляемость в отношении множества физических, химических или биологических воздействий как у больных, так и у здоровых, обладают антиоксидантными, противоканцерогенными, радиопротекторными свойствами и полностью безвредны в терапевтических дозировках [5; 12;

15]. У человека элеутерозиды усиливают апоптоз при раке желудка [13] и увеличивают общее количество Т-лимфоцитов и Т-киллеров [10].

Сесквитерпен азулен, содержащийся в эфирном масле **ромашки аптечной** (*Matricaria chamomilla* L.), обладает седативным, противовоспалительным, антисептическим действием, а флавоноид апиин, превращающийся в организме в апигенин, — спазмолитическим [3].

Комплекс биологически активных веществ **подорожника большого** (*Plantago major* L.): иридоид-гликозиды, фенилэтанола, галактуроновая кислота, флавоноиды и другие вещества проявляют противовоспалительную, антимикробную и выраженную противоопухолевую активность, индуцируют пролиферацию лимфоцитов [1; 11; 20]. Полисахарид РМ-II из листьев подорожника — мощный активатор комплемента, сопоставимый по силе с человеческим иммуноглобулином IgG [18].

Зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) содержит многочисленные активные компоненты, в числе которых гиперичин и гиперфорин, обладающие выраженными антидепрессантными, противоопухолевыми, антибактериальными и противовирусными свойствами [6; 24]. Экстракт зверобоя близок по эффективности к синтетическим антидепрессантам, например, к сертралину или имипрамину, и является единственной среди растений альтернативой синтетическим антидепрессантам, эффективность которого доказана в клинических испытаниях [25]. Гиперфорин подавляет неопластический рост за счет ограничения хемотаксической миграции эпителиальных клеток, а в цитокин-активированных клетках блокирует транскрипцию генов, регулирующих жизнеспособность и инвазивность опухолевых клеток, и матричную металлопротеиназу-2, что препятствует метастазированию [17].

Высушенное корневище **солодки голой** (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch./*Gl. glabra* L.) содержит около 400 изученных биологически активных веществ [12]. Препараты из солодки обладают противовоспалительным и спазмолитическим действием. Глицирризовая и глицирретриновая кислоты блокируют продвижение лейкоцитов к очагу воспаления [3; 14]. Глицирризин селективно ингибирует тромбин [9]. Экстракт из корня солодки защищает слизистую желудка, подавляет секрецию соляной кислоты и предупреждает развитие индуцированных ацетилсалициловой кислотой язв [4].

Экстракты из листьев **толокнянки обыкновенной** (*Arctostaphylos uva-ursi* Spr.) обладают мочегонным и бактерицидным действием за счет гидрохинона (образуется в организме при расщеплении арбутина и выделяется с мочой) и комплекса флавоновых соединений [3; 12].

В **тысячелистнике обыкновенном** (*Achillea millefolium* L.) идентифицировано и изучено около 100 биологически активных компонентов. Он обладает противовоспалительным (за счет сесквитерпен-лактонов, азулена), спазмолитическим (флавоноиды) и антимикробным (эссенциальные летучие масла, сесквитерпен-лактоны) действием и применяется при заболеваниях желудочно-кишечного тракта [3]. Найденный в тысячелистнике метиловый эфир ахиллиловой кислоты показал противоопухолевую активность. В эксперименте на мышах он подавлял рост клеток лейкоза, что приводило к увеличению продолжительности их жизни на 30 % [23].

Препараты из **березы повислой** (*Betula pendula*) используются для лечения инфекционных, воспалительных и спастических расстройств при

пиелонефрите, цистите и уретрите, самостоятельно или в комплексе с другими препаратами. Флавоноиды из листьев и почек березы ингибируют нейтральную металло-эндопротеиназу, которая отвечает за разрушение натрийуретических пептидов и регуляцию экскреции хлористого натрия, что способствует быстрому уропозу и экскреции [12]. Бетулин и бетулиновая кислота оказывают прямое повреждающее действие на митохондрии, вызывая апоптоз опухолевой клетки [16]. Найдена прямая корреляция между чувствительностью опухолевых клеток к воздействию тритерпенов березы и чувствительностью к цитостатикам (даунорубин, митоксантрон) [8]. Выявленную антиоксидантную активность проявляют компоненты из листьев **бадана толстолистного** [19; 22]. Изучена его антимикробная и противогрибковая активность; найдена иммуностимулирующая активность в отношении гуморального и клеточного иммунитета и выявлено подавление адгезии нейтрофилов [7; 21]. Перечисленные лекарственные растения обладают комплексной биологической активностью, подтвержденной как в клинических, так и в лабораторных экспериментах, и могут быть предложены в качестве сопроводительного лечения при РШМ для профилактики ранних лучевых повреждений.

Цель исследования — изучить динамику показателей крови больных раком шейки матки при использовании в сопроводительной терапии дикорастущих лекарственных растений.

Материалы и методы

Клиническое исследование проведено на базе радиологического отделения Алтайского краевого онкологического диспансера в 2006–2008 гг. В него вошли данные о 408 женщинах 24–64 лет с морфологически подтвержденным раком шейки матки T₁–T₃N₀M₀, не имеющих тяжелой сопутствующей соматической патологии. Основная группа — 208 женщин (средний возраст 47,9 лет), контрольная группа — 200 женщин (средний возраст 48,5 лет, p>0,05). Все женщины получали сочетанно-лучевую терапию по стандартным методикам.

Основная группа, кроме лучевого лечения, получала сопроводительную фитотерапию курсами по 2 нед. ежедневно, с перерывом между курсами 2 нед. Первый курс проводился до начала лучевой терапии, второй — во время нее, третий и четвертый — после окончания. Фитопрепараты назначались по разработанной врачом-фитотерапевтом к.м.н. С.В. Корепановым схеме:

1. Официальный экстракт из корней элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* Maxim.) ежедневно внутрь по 25 капель 2 раза в день утром и днем за 30 минут до еды, 14 дней.
2. Отвар сбора, состоящего из смеси в равных весовых частях высушенных свежесобраных дикорастущих лекарственных растений (2 г): травы ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), листьев подорожника большого (*Plantago major* L.), цветков зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), корневища солодки голой (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch./*Gl. glabra* L.), листьев толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uva-ursi* Spr.) и цветков тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), ежедневно внутрь, утром и вечером, за 30 минут до еды, 14 дней.

Таблица 1

Динамика общего анализа крови в основной и контрольной группах

Показатель	Измерение	Группы				p***
		Основная		Контрольная		
		Mean*	SD**	Mean*	SD**	
Гемоглобин, г/л	1	123,896	10,66	124,381	10,89	0,655
	2	119,695	12,12	117,718	12,84	0,148
	3	121,207	10,97	117,104	12,87	0,002
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Эритроциты, 10 ¹² /л	1	3,796	0,257	3,782	0,251	0,403
	2	3,740	0,284	3,692	0,292	0,069
	3	3,709	0,284	3,608	0,324	0,001
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	1	280,85	46,41	273,58	46,96	0,250
	2	253,27	34,64	237,59	39,97	0,000
	3	243,63	38,32	228,46	32,43	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	1	6,92	0,44	7,08	0,30	0,001
	2	4,99	0,49	5,07	0,39	0,559
	3	4,62	0,54	4,47	0,46	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
СОЭ, мм/час	1	19,93	5,52	19,52	4,62	0,714
	2	25,70	6,29	25,12	4,49	0,933
	3	27,01	5,38	28,02	5,32	0,082
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		—
*Среднее; **стандартное отклонение. ***между группами						

Таблица 2

Динамика лейкоцитарной формулы в основной и контрольной группах

Показатель	Измерение	Группы				p***
		Основная		Контрольная		
		Mean	SD	Mean	SD	
Эозинофилы, %	1	2,03	1,02	2,11	1,06	0,295
	2	2,41	1,08	2,27	1,15	0,227
	3	2,59	0,92	2,04	1,04	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1	1,87	0,76	1,84	0,71	0,756
	2	2,16	0,76	2,24	0,66	0,435
	3	1,92	0,77	2,28	0,64	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,046		
Сегментоядерные нейтрофилы, %	1	66,18	2,01	64,36	2,13	0,000
	2	69,20	2,13	67,94	1,63	0,000
	3	68,97	2,97	68,19	1,66	0,011
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Лимфоциты, %	1	27,42	1,73	29,30	1,40	0,000
	2	23,93	2,07	25,11	1,71	0,000
	3	23,62	1,63	21,38	1,58	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Моноциты, %	1	2,69	0,96	2,77	0,90	0,365
	2	2,50	0,98	2,39	0,80	0,389
	3	2,87	0,84	2,31	0,79	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		–
***между группами						

Таблица 3

Динамика биохимических показателей в основной и в контрольной группах

Динамика биохимических показателей в основной и в контрольной группах						
Показатель	Измерение	Группы				p***
		Основная		Контрольная		
		Mean	SD	Mean	SD	
Общий белок, г/л	1	76,4817	1,64134	76,4773	1,61932	0,961
	2	75,5305	1,09903	74,9654	0,70719	0,000
	3	76,2335	0,66999	74,8613	0,68412	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,086		
Протромбиновое время, с	1	17,3603	0,22694	16,6603	0,39823	0,000
	2	17,2315	0,13156	16,9146	0,43409	0,000
	3	17,2662	0,07800	17,1372	0,32803	0,002
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,002		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,003		
Фибриноген, г/л	1	3,5318	0,08627	3,5295	0,09004	0,823
	2	3,5075	0,11063	3,5359	0,22607	0,831
	3	3,5031	0,11546	3,5628	0,04180	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,025; p ₂₋₃ =0,570		p ₁₋₂ =0,116; p ₂₋₃ =0,000		
Креатинин, мкмоль/л	1	52,1106	7,18844	52,5000	7,06609	0,396
	2	55,9663	7,76489	57,1500	5,93495	0,001
	3	53,4760	6,24611	57,2300	6,08541	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,059		
Мочевина, ммоль/л	1	4,8573	0,67228	4,8803	0,65925	0,695
	2	4,8584	0,67058	4,9749	0,65263	0,086
	3	4,8590	0,66960	4,9048	0,65925	0,470
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Общий билирубин, мкмоль/л	1	7,1515	0,40158	7,2379	0,32596	0,027
	2	7,2048	0,40827	7,2885	0,33226	0,028
	3	7,1359	0,40782	7,2893	0,33366	0,000
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Глюкоза, ммоль/л	1	4,8540	0,41742	4,8424	0,42986	0,875
	2	4,8555	0,41782	4,8376	0,43210	0,720
	3	4,8455	0,41608	4,8540	0,42725	0,779
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,002; p ₂₋₃ =0,005		p ₁₋₂ =0,002; p ₂₋₃ =0,041		
Калий, ммоль/л	1	4,7596	0,28154	4,7736	0,27719	0,625
	2	4,7174	0,28722	4,6581	0,30092	0,051
	3	4,7817	0,27911	4,7110	0,28672	0,013
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		p ₁₋₂ =0,000; p ₂₋₃ =0,000		
Натрий, ммоль/л	1	138,9754	1,19853	138,9634	1,21890	0,968
	2	138,9520	1,21848	138,9700	1,21256	0,903
	3	138,9411	1,21137	138,9701	1,21256	0,797
p между измерениями		p ₁₋₂ =0,726; p ₂₋₃ =0,856		p ₁₋₂ =0,566 ; p ₂₋₃ =0,775		–
***между группами						

3. Масляный экстракт березовых почек (*Betula Pendula*) ежедневно в виде микроклизмы по 30 мл в прямую кишку и на ватном тампоне во влагалище, вечером, 14 дней.

Контроль за состоянием пациенток осуществлялся путем клинического наблюдения и оценки тяжести состояния по шкале Карновского, а также проведением общего и биохимического анализов крови (клеточный состав, уровень белка, мочевины, общего билирубина, фибриногена, глюкозы, калия и натрия и др. показатели) непосредственно перед началом лучевой терапии (первое измерение), во время лечения (второе) и после него через две недели (третье).

Значимость различий между группами оценивалась по критериям Манна-Уитни (Mann-Whitney), между переменными внутри группы – по критериям Уилкоксона (Wilcoxon).

Результаты

Средний индекс Карновского в основной группе до начала лечения составил 85,9%, в кон-

трольной – 88%, через две недели после лечения – 89 и 89,5% соответственно, различия статистически не значимы ($p>0,05$).

Динамика показателей крови перед началом лечения, во время и после него приведена в табл. 1. В обеих группах во время лучевой терапии наблюдалась отчетливая отрицательная динамика общего анализа крови: снижались средние уровни гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и повышалась СОЭ (между измерениями показателей $p<0,001$). Минимальный средний уровень гемоглобина в основной группе наблюдался при втором измерении (во время лучевого лечения), а при третьем измерении (после лечения) он был выше ($p_{2-3}=0,000$). В контрольной группе при третьем измерении наблюдался минимальный средний уровень гемоглобина, и он был значимо ниже, чем в основной группе ($p=0,002$). Среднее количество эритроцитов в основной группе при третьем измерении было выше, чем в контрольной ($p=0,001$). Среднее количество тромбоцитов было выше в основной группе при втором и при третьем измерении ($p<0,001$).

Среднее количество лейкоцитов было статистически значимо выше в контрольной группе до начала лечения (первое измерение, $p=0,001$), после лечения этот показатель принял более высокие значения в основной группе ($p=0,000$). Средние значения СОЭ не имели статистически значимых различий между группами.

Динамика лейкоцитарной формулы показана в табл. 2. При первом и втором измерениях не наблюдалось статистически значимых различий между основной и контрольной группами по средним уровням эозинофилов, палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов ($p>0,05$), а средний уровень лимфоцитов был выше в контрольной группе ($p=0,000$). Во время лечения в обеих группах наблюдалась отрицательная динамика лейкоцитарной формулы: уменьшалось среднее количество лимфоцитов и моноцитов, увеличивалось среднее количество палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов ($p<0,001$). При третьем измерении показателей в основной группе был найден более высокий средний уровень лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов, и более низкий средний уровень палочкоядерных нейтрофилов ($p<0,001$).

Динамика биохимических показателей приведена в табл. 3. Во время лучевой терапии в обеих группах наблюдалась следующая динамика биохимических показателей крови: уменьшалось среднее содержание белка и калия, повышались средние уровни креатинина, мочевины, общего билирубина ($p<0,001$).

При втором измерении средний уровень белка сыворотки крови в основной группе был выше, чем в контрольной, а при третьем измерении (после лечения) в основной группе этот показатель несколько увеличился по сравнению со вторым, а в контрольной продолжал снижаться. Средний уровень протромбина в основной группе был выше, чем в контрольной при всех измерениях, а средний уровень фибриногена был выше в контрольной группе при третьем измерении.

Средний уровень креатинина при втором и третьем измерении был выше в контрольной группе. При третьем измерении в основной группе он снизился, а в контрольной продолжал повышаться. Средний уровень билирубина в основной группе был более низким при всех измерениях. Средний уровень калия в контрольной группе был ниже при втором и третьем измерении, чем в основной. Статистически значимых различий в средних уровнях мочевины, глюкозы и натрия между группами не было найдено.

Выводы

1. В обеих группах наблюдалась отчетливая отрицательная динамика показателей общего и биохимического анализов крови: снижались средние уровни гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, белка и калия сыворотки и повышались средние уровни СОЭ, креатинина, мочевины и общего билирубина, наблюдались изменения в лейкоцитарной формуле.
2. В основной группе в конце лучевой терапии (третье измерение показателей) наблюдались статистически значимо более высокие средние уровни гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов, в том числе лимфоцитов и моноцитов, более высокий средний уровень белка, протромбина и более низкие средние уровни фибриногена, креатинина и билирубина.
3. В целом в основной группе отклонения показателей крови от нормальных уровней во время лечения носили менее выраженный характер и быстрее возвращались к нормальному уровню после лечения, чем в контрольной.

Литература

1. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Растения в комплексной терапии опухолей. – М.: Издательство РАМН, 2008. – 232 с.
2. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А.Герцена» Минздрава России, 2012. – 260 с.
3. Шутинская М.Д., Карпович В.К. Фармакогнозия. Изд. четвертое, переработанное и дополненное. – Л.: Изд. «Медицина», Ленинградское отделение, 1970. – 352 с.
4. Bennett A., Melhuish P.B., Stamford I.F. Carbenoxolone and deglycyrrhized liquorice have little or no effect on prostanoid synthesis by rat gastric mucosa ex vivo // Br J Pharmacol. – 1985. – 86(3). – P. 693–5.
5. Bleakney T.L. Deconstructing an adaptogen: Eleutherococcus senticosus // Holist Nurs Pract. – 2008. – 22(4). – P. 220–4.
6. Brenner R., Azbel V., Madhusoodanan S., Pawlowska M. Comparison of an extract of hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study // Clin Ther. – 2000. – 22(4). – P. 411–9.
7. Churin A.A., Masnaia N.V., Sherstoboev E.Y., Suslov N.I. Effect of *Bergenia crassifolia* extract on specific immune response parameters under extremal conditions // Eksp Klin Farmakol. – 2005. – 68(5). – P. 51–4.
8. Drag M., Surowiak P., Drag-Zalesinska M. et al. Comparison of the cytotoxic effects of birch bark extract, betulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines // Molecules. – 2009. – 14(4). – P. 1639–51.
9. Francischetti I.M., Monteiro R.Q., Guimarães J.A. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor // Biochem Biophys Res Commun. – 1997. – 235(1). – P. 259–63.
10. Gaffney B.T., Hugel H.M., Rich P.A. The effects of *Eleutherococcus senticosus* and *Panax ginseng* on steroid hormone indices of stress and lymphocyte subset numbers in endurance athletes // Life Sci. – 2001. – 70. – P. 431–42.
11. Gomez-Flores R., Calderon C.L., Scheibel L.W. et al. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract // Phytother Res. – 2000. – 14(8). – P. 617–22.
12. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. A Handbook for Practice on a Scientific Basis / Edited by Prof. Dr. Max Wichtl. – Medpharm, Scientific Publishers Stuttgart, 2004. – P. 704.

13. Hibasami H., Fujikawa T., Takeda H. et al. Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells // *Oncol Rep.* – 2000. – 7. – P. 1213–6.
14. Kimuraa M., Inoueb H., Hirabayashib K. et al. Glycyrrhizin and some analogues induce growth of primary cultured adult rat hepatocytes via epidermal growth factor receptors // *Eur. J. of Pharmacol.* – 2001. – 431(2). – P. 151–61.
15. Kormosh N., Laktionov K., Antoshechkina M. Effect of a combination of extract from several plants on cell-mediated and humoral immunity of patients with advanced ovarian cancer // *Phytother Res.* – 2006. – 20(5). – P. 424–5.
16. Liu W.K., Ho J.C., Cheung F.W. et al. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line // *Eur J Pharmacol.* – 2004. – 498(1–3). – P. 71–8.
17. Lorusso G., Vannini N., Sogno I. et al. Mechanisms of Hyperforin as an anti-angiogenic angioprevention agent // *Eur J Cancer.* – 2009. – 45(8). – P. 1474–84.
18. Michaelsen T.E., Gilje A., Samuelsen A.B. et al. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. // *Scand J Immunol.* – 2000. – 52(5). – P. 483–90.
19. Mironova G.D., Shigaeva M.I., Belosludtseva N.V. et al. Effect of several flavonoid-containing plant preparations on activity of mitochondrial ATP-dependent potassium channel // *Bull Exp Biol Med.* – 2008. – 146(2). – P. 229–33.
20. Ozaslan M., Didem Karagöz I., Kalender M.E. et al. In vivo antitumoral effect of *Plantago major* L. extract on Balb/C mouse with Ehrlich ascites tumor // *Am J Chin Med.* – 2007. – 35(5). – P. 841–51.
21. Popov S.V., Popova G.Y., Nikolaeva S.Y. et al. Immunostimulating activity of pectic polysaccharide from *Bergenia crassifolia* (L.) // *Fritsch. Phytother Res.* – 2005. – 19(12). – P. 1052–6.
22. Ryzhikov M.A., Ryzhikova V.O. Application of chemiluminescent methods for analysis of the antioxidant activity of herbal extracts. // *Vopr Pitan.* – 2006. – 75(2). – P. 22–6.
23. Tozyo T., Yoshimura Y., Sakurai K. et al. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium* // *Chem Pharm Bull (Tokyo).* – 1994. – 42(5). – P. 1096–100.
24. Vacek J., Klejdus B., Kubán V. Hypericin and hyperforin: bioactive components of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). Their isolation, analysis and study of physiological effect // *Ceska Slov Farm.* – 2007. – 56(2). – P. 62–6.
25. Wurglics M., Schubert-Zsilavecz M. *Hypericum perforatum*: a 'modern' herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients // *Clin Pharmacokinet.* – 2006. – 45(5). – P. 449–68.

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006.448:577.175.722

С.С. Шушанов

**РОЛЬ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 ТИПА (IGF-1)
И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ЧЛЕНОВ СИСТЕМЫ IGF/ИНСУЛИН
В ПРОГРЕССИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ**

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

Контактная информация:

Шушанов Саин Сакенович, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-17-69

e-mail: sainHershny@yandex.ru

Статья поступила 03.02.2012, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

Множественная миелома – злокачественное лимфопролиферативное заболевание, которое характеризуется инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками и остеолитическим поражением костей. В ходе исследований было показано, что взаимодействие миеломных клеток с клетками стромы костного мозга активирует в последних транскрипцию и секрецию цитокинов и ростовых факторов, в том числе и инсулиноподобного фактора роста 1 типа (IGF-1), который является членом системы IGF/инсулин. Исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что IGF-1 усиливает пролиферацию, выживание и миграцию миеломных клеток, а также участвует в регуляции механизмов возникновения лекарственной устойчивости и разрушения кости. Данный обзор посвящен обсуждению роли IGF-1 и некоторых других членов системы IGF/инсулин в прогрессии множественной миеломы.

Ключевые слова: множественная миелома, костный мозг, микроокружение, выживаемость, пролиферация, инсулиноподобный фактор роста 1 типа (IGF-1), рецептор.

S.S. Shushanov

**THE ROLE OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR TYPE-1 (IGF-1)
AND SOME OTHER MEMBERS OF IGF/INSULIN SYSTEM
IN THE PROGRESSION OF MULTIPLE MYELOMA**

FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

Abstract

Multiple myeloma is a malignant lymphoproliferative disease with the infiltration of bone marrow by the plasma cells and associates with the osteolytic bone lesions. It was shown that the interaction of MM cells to bone marrow stromal cells activates the transcription and secretion of cytokines and growth factors, including insulin-like growth factor type-1 (IGF-1) which is belong to the IGF/insulin system. The studies *in vivo* and *in vitro* have shown that IGF-1 promote tumor growth, survival, drug resistance and bone destruction. In his review the role of the IGF-1 and some other members of the IGF/insulin system in multiple myeloma progression will be discussed.

Key words: multiple myeloma, bone marrow, microenvironment, survival, proliferation, insulin-like growth factor type-1 (IGF-1), receptor.

Введение

Множественная миелома – злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и/или моче и остеолитическими поражениями костей [1]. В соответствии с классификацией ВОЗ ММ относится к периферическим В-клеточным лимфоидным опухолям [49]. ММ составляет 1% от всех онкологических заболеваний и 13% от всех гемобластозов (неопластических заболеваний кроветворной и лимфатической ткани) [83]. Причины развития ММ у человека остаются неясными. Веских аргументов в пользу индуцирующего влияния ионизирующей радиации и токсических веществ не получено [1;

15]. В настоящее время большинство ведущих исследователей считают, что опухолевая трансформация В-лимфоцитов при ММ происходит в герминальном центре периферических лимфоидных органов после соматических гипермутаций реаранжированных генов иммуноглобулинов и изотипического переключения синтеза антител [1; 27; 57]. Предполагают, что во время созревания нормальной В-клетки происходят ошибки, которые приводят к хромосомным транслокациям с вовлечением генов иммуноглобулинов, в частности – локуса H-цепи (IgH) на хромосоме 14 в области 4q32 [105]. Результаты изучения наиболее типичных хромосомных транслокаций с вовлечением локусов генов иммуноглобулинов позволили идентифицировать ряд потенциальных онкогенов, которые играют важную роль в патогенезе этого заболевания [28].

В дальнейшем плазмобласты (предшественники плазматических клеток) и клетки памяти, перенесшие опухолевую трансформацию, как и нормальные аналогичные клетки, возвращаются в костный мозг. В костном мозге при взаимодействии с элементами костномозгового окружения (фибробластами, белками внеклеточного матрикса) трансформированные плазмобласты проходят окончательный этап созревания до плазматических клеток – получают соответствующие сигналы для выживания и пролиферации, формируют опухолевый клон, секретируют моноклональный иммуноглобулин (М-белок), активируют остеокласты, которые впоследствии индуцируют остеолитическое поражения кости [16; 64; 111].

Длительность жизни больных ММ в основном зависит от чувствительности к лечению противоопухолевыми препаратами. Часто в результате лечения у больных развивается резистентность к самым разным химиопрепаратам, различающимся и по химической структуре, и по механизму действия. Иными словами, возникает множественная лекарственная устойчивость, которая является на сегодня одной из существенных проблем при лечении больных ММ [2; 3].

За последние два десятилетия исследований механизмов прогрессии ММ *in vitro* на моделях первичных клеток ММ и линий клеток ММ, а также *in vivo* на моделях лабораторных животных накопилось много знаний в этой области экспериментальной онкологии. В ходе исследований было показано, что взаимодействие клеток ММ с клетками стромы костного мозга активирует в последних транскрипцию и секрецию цитокинов и ростовых факторов, в том числе – и IGF-1, который, как было установлено, усиливает пролиферацию, выживание и миграцию клеток ММ, а также имеет прямое отношение к возникновению устойчивости к общепринятым химиопрепаратам [45; 71]. Также было показано, что клетки ММ, взаимодействуя с эндотелием кровеносных сосудов в микроокружении костного мозга, экспрессируют на своей поверхности рецептор IGF-1 (IGF-1R), который является рецепторной тирозинкиназой [71].

Цель данного обзора – системное освещение ранних и современных литературных данных, посвященных роли инсулиноподобных факторов роста и инсулина, а также их рецепторов в молекулярных механизмах злокачественной прогрессии ММ: миграции, выживании, пролиферации и лекарственной устойчивости.

Система IGF/инсулин

Система IGF/инсулин является на сегодня наиболее важной и широко изучаемой в онкологии. Ее роль в инициации, прогрессии и метастазировании злокачественных новообразований является доказанной во многих типах опухолей человека и на различных моделях животных.

Система IGF/инсулин (рис. 1) включает инсулин и ростовые факторы IGF-1, IGF-2, шесть типов IGF- связывающих и регулирующих белков (IGFBP) и их протеаз, а также различные изоформы и комбинации их общих рецепторов: IGF-1R, IGF-1R/IR-A, IGF-1R/IR-B, IR-A, IR-B, активация которых опосредует сигналы, играющие различные роли в физиологии клетки, такие как: развитие, рост, дифференцировка, регуляция метаболизма, подвижность, опухолеродность чувствительность к апоптозу, ангиогенез, экспрессия молекул адгезии [42; 63; 87].

Аминокислотные последовательности IGF-1 и IGF-2 гомологичны на 62% [109], а с инсулином – приблизительно на 50 % [53]. В литературе описаны две изоформы мРНК IGF-1 (IGF-1A и IGF-1B), которые образуются в результате альтернативного сплайсинга, при этом обе изоформы сохраняют нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерный пептид IGF-1, а С-концевые нуклеотидные последовательности этих двух изоформ кодируют два различных пептида, EA и EB. Функциональные значения изоформ мРНК IGF-1A и IGF-1B до конца неизвестны и в настоящее время исследуются. Установлено, что про-IGF-1 пептид выделяется из клетки в межклеточное пространство, а про-IGF-1B пептид является активной внутриклеточной изоформой и обнаруживается в ядре клетки и, по-видимому, имеет регуляторную функцию [104]. Предполагается, что количественное соотношение этих изоформ может являться одним из факторов, определяющих дальнейшую судьбу клетки, т.е. в случае преобладания одной изоформы клетка будет пролиферировать, а другой – дифференцироваться [11].

Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 типа (IGF-1R) – рецепторная тирозинкиназа, гетеротетрамер, состоящий из двух внеклеточных α -субъединиц, связывающихся с лигандом, и двух внутриклеточных β -субъединиц, содержащих тирозинкиназный домен. IGF-1R и рецептор инсулина (IR), который также является рецепторной тирозинкиназой, имеют 84% гомологию в аминокислотной последовательности их тирозинкиназных доменов [6]. Рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 типа (IGF-2R) не имеет тирозинкиназной активности и, как предполагается, служит для удаления IGF-2 из экстраклеточного окружения путем связывания его на поверхности клетки [29; 54]. Аффинность связывания IGF-1 с IGF-1R превышает аффинность связывания IGF-2 с IGF-1R от 2 до 15 раз [50]. Инсулин связывается с IGF-1R от 100 до 1000 раз слабее, чем IGF-1 [25]. Однако, учитывая, что количество циркулирующего в крови IGF-1 приблизительно в 100 раз превышает количество инсулина, было показано, что IGF-1 связывается и активирует IR [65]. IGF-2R связывает IGF-2 в 500 раз сильнее, чем IGF-1 и совсем не связывает инсулин [53]. IGF-2 связывается с одинаковой аффинностью с двумя изоформами рецептора инсулина IR-A и IR-B, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга мРНК [32; 107].

Также имеются гибридные рецепторы, гетеродимеры: IGF-1R/IR-A, IGF-1R/IR-B [72]. Сообщается, что в зависимости от присутствия той или иной изоформы рецептора инсулина, указанные гибридные рецепторы индуцируют различные сигналы и имеют разные биологические функции [78]. Вместе с тем, роль и значимость такого перекрестного многообразия взаимодействий указанных ростовых факторов и их рецепторов для клетки остаются недостаточно выясненными и спорными. В литературе обсуждаются вопросы относительно селективности сигналов, поступающих после активации перечисленных рецепторов, и их роли в биологии клетки. Имеются данные о том, что связывание IGF-2 с IR-A изоформой опосредует пролиферативные эффекты, тогда как связывание с IR-B изоформой опосредует метаболические эффекты [32; 61]. IGF-связывающие белки участвуют в транспортировке инсулиноподобных факторов роста из печени в различные органы, стабилизируют их в ходе транспортировки, регулируют взаимодей-

ствия IGF-1 и IGF-2 с рецепторами [87]. Кроме того, IGF-связывающие белки могут и сами, независимо от их IGF-связывающих функций, участвовать в биологических процессах [77].

**Роль IGF-1 и его рецептора IGF-1R
в селективной локализации клеток
миеломы в костном мозге**

Одним из ключевых свойств клеток миеломы является их селективное возвращение в костный мозг («хоуминг»). Этот процесс является многоступенчатым и, прежде чем попасть в микроокружение костного мозга, мигрирующие по кровеносному руслу клетки миеломы на первом этапе под воздействием специфических хемоаттрактантов должны притянуться к поверхности эндотелия, закрепиться на ее поверхности, далее активироваться и трансмигрировать через стенки капилляров, а затем, разрушив базальную мембрану, инвазировать во внеклеточный матрикс [111] (рис. 2).

Одним из идентифицированных хемоаттрактантов для клеток ММ является IGF-1, который экспрессируется клетками стромы (фибробластами), а также остеобластами [13; 18] и в высокой концентрации присутствует в микроокружении костного мозга [5; 51; 60]. Роль IGF-1 в хемотаксисе была доказана в ряде экспериментов *in vitro* как на линиях клеток миеломы человека [82; 96], так и на клетках миеломы мыши, а также *in vivo* на мышях. Например, было показано, что миеломные клетки мыши активно мигрируют в направлении кондиционированной среды от фибробластов, полученных из стромы костного мозга. Когда в такую кондиционированную среду добавляли антитела к IGF-1, то миграция миеломных клеток заметно уменьшалась [69; 111]. В другом эксперименте было показано, что миеломные клетки мыши линий 5T2MM и 5T33MM, экспрессирующие на своей поверхности IGF-1R, мигрируют в направлении экзогенного IGF-1. Напротив, миеломные клетки линии 5T33MMvt, которые не экспрессируют IGF-1R, не мигрируют в направлении IGF-1 [100; 101]. Однако, если клетки 5T33MMvt инъецировать в мышь, то они начинают экспрессировать на своей поверхности IGF-1R и это коррелирует с их способностью мигрировать в направлении IGF-1 [103]. В дальнейших экспериментах *in vitro* было установлено, что экспрессия IGF-1R активируется после взаимодействия клеток 5T33MMvt с эндотелием костного мозга [8]. Если клетки 5T33MMvt вернуть в условия культивирования без эндотелия костного мозга, то экспрессия IGF-1R прекращается через 10 дней [8]. Также было показано, что клетки миеломы мыши 5T2, инъецированные в мышь и обнаруженные через 18 часов в микроокружении костного мозга, сильнее экспрессируют на своей поверхности IGF-1R, чем до инъекции [100].

Таким образом, можно предположить, что миеломные клетки, экспрессирующие на своей поверхности пусть даже небольшое количество IGF-1R, при взаимодействии с эндотелием костного мозга увеличивают экспрессию IGF-1R, что, в свою очередь, усиливает их дальнейшую трансмиграцию через стенки капилляров и базальную мембрану в направлении IGF-1, который, как было сказано выше, в высокой концентрации присутствует в микроокружении костного мозга.

Как только клетки миеломы под воздействием IGF-1 притягиваются и взаимодействуют с эндотелием сосудов, окружающих костный мозг, они активируются и экспрессируют адгезионные моле-

кулы, чтобы закрепиться на поверхности эндотелия. Некоторые из этих адгезионных молекул являются необходимыми на последующих стадиях «хоуминга», чтобы связаться с белками внеклеточного матрикса и с фибробластами в строме костного мозга. Одной из таких адгезионных молекул, экспрессирующихся при взаимодействии миеломных клеток с эндотелием, является интегрин $\beta_4\alpha_1$ (VLA-4). Показано, что для клеток миеломы человека интегрин $\beta_4\alpha_1$ является важным адгезионным рецептором, который опосредует связывание опухолевой клетки с фибронектином и адгезионными молекулами кровеносного сосуда, и его экспрессия регулируется IGF-1 [96]. Также показано, что IGF-1 индуцирует локализацию IGF-1R и интегрин $\beta_4\alpha_1$ на активном крае плазматической мембраны миеломных клеток [96]. Поскольку связывание миеломных клеток с фибронектином коррелировало с активацией PI3K, Akt/PKB киназы, фосфорилированием FAK и паксиллина, было предположено, что этот сигнальный путь вовлечен в процесс миграции клеток миеломы [96]. Позднее было установлено, что в регулировании IGF-1 опосредуемой миграции и инвазии клеток миеломы человека участвуют PI3K/PKC $_{\alpha}$ и PI3K/RhoA – зависимые сигнальные пути [82].

На следующем этапе «хоуминга» закрепившиеся на поверхности эндотелия сосудов клетки миеломы инвазируют в микроокружение костного мозга через стенки кровеносных сосудов и базальную мембрану. Этот процесс осуществляется благодаря участию семейства MMP и активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), экспрессируемых клетками миеломы и деградирующих различные компоненты внеклеточного матрикса и базальной мембраны [23; 52; 75].

Было показано, что клетки миеломы человека продуцируют металлопротеиназы MMP-2, MMP-7 и MMP-9 [9; 10; 62]. В литературе имеются данные о том, что IGF-1 может регулировать экспрессию MMP-9, которая является желатиназой и коллагеназой IV типа [70]. Как специфический хемоаттрактант, продуцируемый клетками стромы костного мозга, IGF-1 притягивает миеломные клетки и после разрушения компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны способствует их трансмиграции через стенки капилляров и базальную мембрану.

Как только клетки миеломы оказываются в микроокружении костного мозга, они подвергаются прямому воздействию IGF-1, который является для клеток миеломы фактором выживания и стимулирует клетки миеломы к пролиферации.

**Роль IGF-1 и его рецептора IGF-1R
в выживании клеток ММ**

Одним из характерных свойств злокачественных клеток является нарушение механизмов, регулирующих запрограммированную клеточную гибель – апоптоз. В результате опухолевые клетки становятся менее чувствительными по сравнению с окружающими их нормальными клетками к различным стрессовым воздействиям, таким как недостаточность факторов роста, поломки ДНК, вызванные ионизирующей радиацией, тепловой шок, действие противоопухолевых препаратов, направленных на активацию апоптоза и т.д.

Иными словами, менее чувствительные к апоптозу опухолевые клетки получают преимущество в борьбе за выживание, что является еще одним шагом на пути к злокачественной прогрессии.

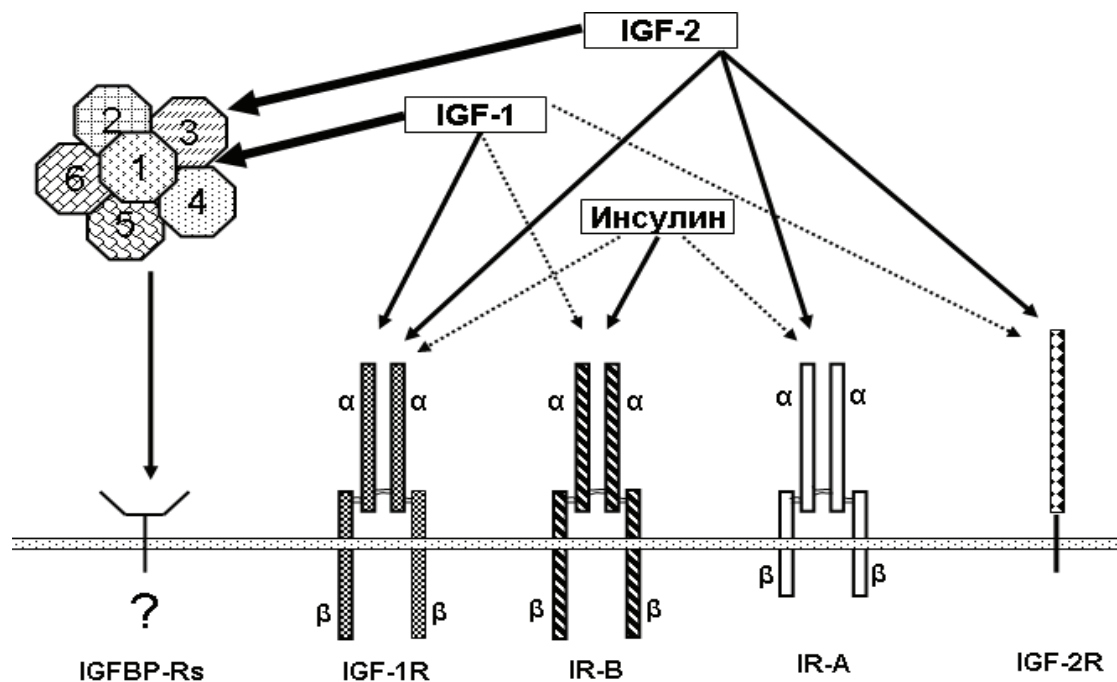


Рис. 1. Схема взаимодействия между IGF-1, IGF-2, инсулина с их рецепторами и IGF-связывающими белками. Взаимодействия, указанные жирными стрелками, имеют наибольшую аффинность, прерывистые стрелки соответствуют слабой аффинности. (Схема нарисована автором данной статьи С.С. Шушиановым).

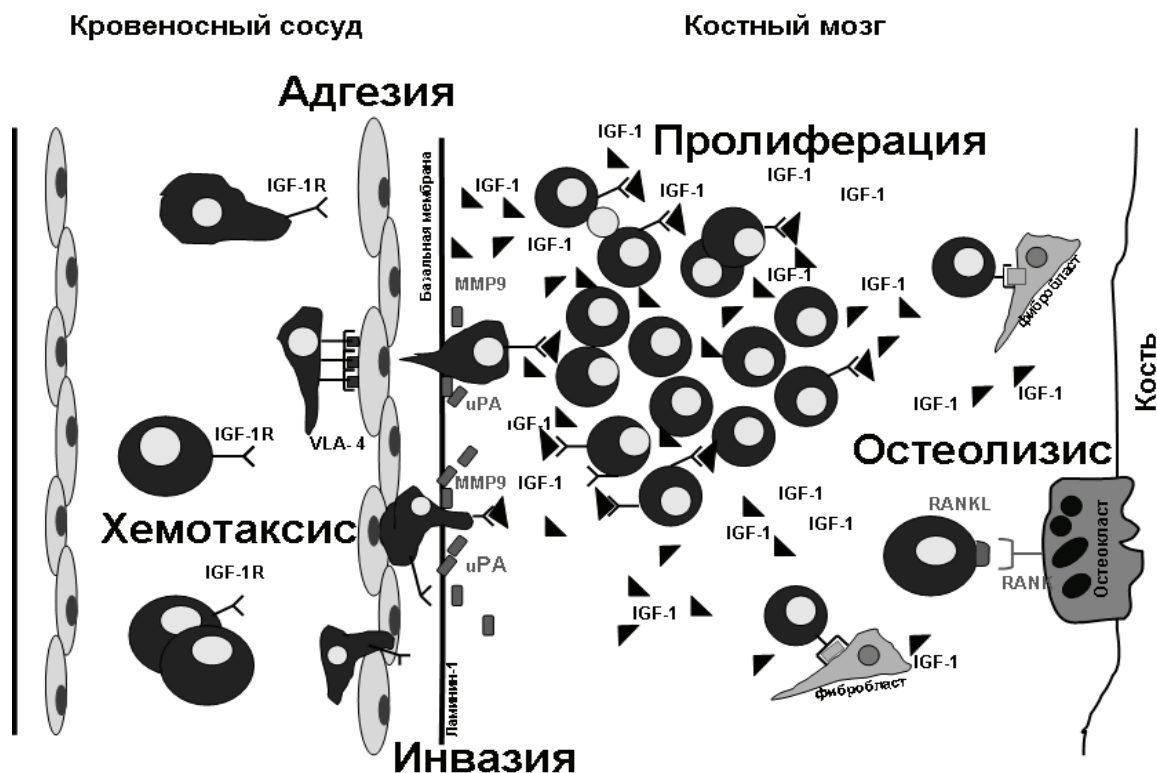


Рис. 2. Схема многоступенчатого селективного возвращения клеток множественной миеломы в микроокружение костного мозга.

Прежде чем попасть в микроокружение костного мозга, мигрирующие по кровеносному руслу клетки миеломы под воздействием IGF-1 притягиваются к поверхности эндотелия (хемотаксис), закрепляются на ее поверхности (адгезия), далее активируются и трансмигрируют через стенки капилляров в микроокружение костного мозга (инвазия). В микроокружении костного мозга IGF-1 активирует в клетках ММ антиапоптотические механизмы, придавая злокачественным клеткам преимущество в борьбе за выживание, а также стимулирует их к пролиферации. Взаимодействие RANKL, экспрессирующихся на поверхности клеток миеломы, с RANK, экспрессирующимся на поверхности предшественников остеокластов, приводит к дифференцировке предшественников остеокластов в остеокласты, которые активируются и разрушают костную ткань (Схема нарисована автором данной статьи С.С. Шушиановым).

На сегодня известны различные факторы, участвующие в механизмах регуляции апоптоза, и одним из них являются IGF-1 и его рецептор IGF-1R, которые во многих типах опухолей проявляют антиапоптотические функции. В линиях клеток ММ человека IGF-1/IGF-1R опосредуемый сигнальный путь ингибирует апоптоз, индуцированный культивированием клеток в среде без сыворотки [38] или добавлением в культуральную среду дексаметазона [74; 76; 106]. Некоторые линии клеток ММ, как, например Karpas 707, сами экспрессируют IGF-1, который аутокринным образом активирует IGF-1R на поверхности клеток [38]. Если в клетках Karpas 707 инактивировать IGF-1R антителами α IR3, то аутокринная стимуляция IGF-1R прекратится, и тогда активируется каспаза 3, последняя в цепи цистеиновых протеиназ, которая индуцирует апоптоз. Таким образом, аутокринная стимуляция IGF-1R в клетках Karpas 707 является непрерывной и вполне достаточной для ингибирования апоптоза, зависящего от каспазы 3. В обычной культуральной среде, содержащей сыворотку, непрерывная аутокринная стимуляция IGF-1R приводит к невысокому, однако достаточно хорошо заметному, так называемому базальному уровню фосфорилирования Akt по сериновому остатку в положении 473. Вместе с тем, если к клеткам Karpas 707 добавить экзогенный IGF-1, уровень фосфорилирования Akt заметно возрастет [38]. Учитывая тот факт, что IGF-1 в большом количестве присутствует в сыворотке, а также в микроокружении костного мозга, где он продуцируется различными типами клеток, в том числе фибробластами и остеобластами, можно предположить, что *in vivo* клетки ММ получают от IGF-1 дополнительную паракринную стимуляцию. Подтверждением этого сценария был недавно выявленный факт, что для выживания клеток ММ, полученных от больных, необходима экзогенная активация IGF-1/IGF-1R сигнального пути [1].

Предполагается, что одним из центральных сигнальных путей, регулирующих выживаемость клеток ММ, является PI3K/Akt сигнальный путь, который активируется в ответ на воздействие различных факторов роста, в том числе и IGF-1 [46; 48]. Ras/MAPK-сигнальный путь также вовлечен в регуляцию выживания клеток ММ, однако, как было показано в ряде экспериментов с использованием различных ингибиторов, этот сигнальный путь оказался менее эффективным для выживания клеток ММ чем PI3K/Akt путь сигнальной трансдукции [30; 37; 46; 97]. Еще одним сигнальным путем, участвующим в регуляции выживания клеток ММ, является 14-3-3-зависимый сигнальный путь [67]. 14-3-3 – это семейство высоко гомологичных белков, включающее 7 известных изоформ [34]. Активация IGF-1R/14-3-3 сигнального пути приводит к транслокации Raf в митохондрию и последующему фосфорилированию BAD, и, в конечном итоге, ингибированию апоптоза [73]. Главные мишени IGF-1R/PI3K/Akt сигнального пути, регулирующие выживание клеток ММ, окончательно не выявлены.

Предполагается, что одним из участников в PI3K/Akt зависимой цепи передачи сигналов являются I κ B киназы, которые при фосфорилировании активируют транскрипционный фактор NF- κ B. В свою очередь, NF- κ B может регулировать экспрессию ряда генов, имеющих антиапоптотические активности, например, таких как: cIAP2 [113], cFLIP [58] bcl-x_L [17; 91]. Другим известным сигнальным путем, участвующим в регуляции апопто-

за, является PI3-K/Akt/BAD сигнальный путь, в котором фосфорилирование BAD приводит к активации антиапоптотических белков, входящих в семейство bcl₂ (bcl₂, bcl-x_L, bcl-w, bfl-1, bag-1, mcl-1, A1) [24; 108]. Однако в литературе имеются данные, свидетельствующие в пользу того, что и bcl-x_L, и bcl₂ могут регулироваться в результате активации другого, PI3-K независимого пути передачи сигнала. Например, в линии клеток миеломы человека U266 апоптотический эффект наблюдался в результате конститутивной активации JAK/STAT сигнального пути, при котором Stat-3 ингибировал экспрессию bcl-x_L, и, как следствие, индуцировался апоптоз [112]. Кроме того было показано, что Stat-3 конститутивно активирован в мононуклеарных клетках костного мозга, полученных от больных ММ, а также в линиях клеток ММ, устойчивых к апоптозу, индуцированному Fas [94]. Таким образом, JAK/STAT сигнальный путь также вовлекается в выживаемость клеток ММ.

Также в литературе имеются сведения о роли PI3-K/Akt зависимой киназы GSK-3 β в регуляции апоптоза [47; 79; 92]. Субстратами GSK-3 β являются: гликоген синтаза, циклин D₁, эукариотический фактор инициации eIF2B, tau (белок ассоциированный с микротрубочками), а также транскрипционные факторы: c-jun, c-myc, β -catenin NF- κ B [31; 40]. В отличие от большинства киназ, GSK-3 β является конститутивно активированной киназой и его активность ингибируется различными факторами роста, в том числе инсулином и IGF-1 в результате Akt-зависимого фосфорилирования по остатку серина в положении 21 и/или 9 [20]. В миеломных клетках Karpas 707 IGF-1R/PI3-K/Akt сигнальный путь конститутивно активирован и, в соответствии с этим, отмечается невысокий, однако достаточно хорошо заметный, так называемый базальный уровень фосфорилирования GSK-3 β по сериновому остатку в положении 9. Добавление к клеткам Karpas 707 экзогенного IGF-1 увеличивает степень фосфорилирования GSK-3 β по этому сайту. Вместе с тем, использование ингибиторов GSK-3 β , например LiCl или SB415286, только частично уменьшает апоптотический эффект, вызванный дексаметазоном, в присутствии или без α IR3, или ингибиторов PI3-K, что свидетельствует о частичном участии GSK-3 β в противоапоптотическом сигнальном пути, активируемом IGF-1R/PI3-K/Akt.

Роль IGF-1 в регуляции пролиферации клеток ММ

Роль IGF-1 в прогрессии клеточного цикла впервые была исследована группой R. Baserga еще в 1993 г. [12; 84]. Показано, что в большинстве типов клеток взаимодействия между IGF-1 и IGF-1R достаточно, чтобы клетки вошли в клеточный цикл и начали делиться. Экспрессия IGF-1R является решающим фактором, который переключает клетку из состояния «не митогенная» в состояние «митогенная». В согласии с этой гипотезой, клетки Balb/c-3T3 стабильно трансфицированные вектором, кодирующим IGF-1R, могли расти в присутствии IGF-1 лиганда. Если клетки экспрессировали одновременно и фактор роста IGF-1, и его рецептор IGF-1R, они могли расти в отсутствии каких-либо других экзогенных факторов роста [80]. IGF-1 оказывает выраженный митогенный эффект и на многие типы злокачественных клеток [109], в том числе – на линии клеток ММ [33; 38; 74]. Этот эффект, по-видимому, опосредуется главным образом через IGF-1R, однако другой рецептор IRA, который

имеет высокую аффинность к IGF-2, также участвует в активации пролиферации опухолевых клеток [89]. Инсулин, известный как фактор, регулирующий метаболизм глюкозы, тоже может оказывать достаточно сильный митогенный эффект на опухолевые клетки. Возможно, что в этом случае его эффект проявляется в результате связывания с IGF-1R. Также имеются данные, свидетельствующие в пользу того, что инсулин может оказывать митогенный эффект, связываясь и со своим собственным рецептором [14; 39]. Недавно А.С. Sprynski и др. показали, что инсулин в физиологических концентрациях является для клеток ММ таким же митогеном, как и IGF-1, и стимулирует рост клеток ММ, содержащих IGF-1R/IR гибридный рецептор. В таких гибридных рецепторах инсулин индуцирует фосфорилирование как IGF-1R, так и IR [95]. Эта же группа исследователей установила, что IR экспрессируется в клетках ММ в 203/206 случаях вновь диагностированных больных ММ [95]. Мы также исследовали экспрессию двух изоформ мРНК IR и показали, что в мононуклеарной фракции клеток аспиратов костного мозга больных множественной миеломой экспрессия мРНК IR-A обнаруживается у 100% больных, а экспрессия мРНК IR-B – у 32% больных [4]. Возможно, что А-изоформа IR действительно играет важную роль как в пролиферации, так и в биологии клеток ММ в целом, однако однозначного ответа на этот вопрос пока нет, и исследования в этом направлении продолжают. На фибробластах мыши недавно было установлено, что не только инсулин и IGF-2 связываются с IR-A, но и IGF-1 может связываться с IR-A, и, хотя в меньшей степени, активирует его аутофосфорилирование по сравнению с IGF-2, тем не менее, достаточно заметно индуцирует нижележащий от IR-A сигнальный путь внутри клетки [86]. В литературе накопилось много работ, посвященных изучению сигнальных путей, активируемых в результате различных лиганд-рецепторных взаимодействий между инсулином, IGF-1, IGF-2, IGFBR и их рецепторами IGF-1R, IR. Но на сегодня в этой области экспериментальной онкологии еще многое остается неизученным [35]. Считается, что пролиферация клеток ММ находится под контролем RAS-MAPK сигнального пути, в то время, как PI3K/Akt сигнальный путь ассоциируется с анти-апоптотическими функциями [37]. Вместе с тем было показано, что в миеломных клетках RPMI8226 RAS-MAPK сигнальный путь не участвует в пролиферации [110].

Особый интерес представляет тот факт, что IGF-1 может проявлять свои функции во взаимодействии с другими факторами. Например, он индуцирует деление клетки во взаимодействии с эпидермальным фактором роста (EGF) и тромбоцитарным (PDGF) ростовым фактором [19; 26]. В других работах было показано, что PDGF и основной фактор роста фибробластов (bFGF) активируют экспрессию IGF-1R [44; 85].

Что касается PDGF и bFGF, то они, как было показано, могут продуцироваться самими клетками миеломы в костном мозге [99; 101].

Также было показано, что IGF-1 стимулирует пролиферацию как IL-6 зависимых, так и IL-6 независимых линий миеломных клеток человека, воздействуя на клетки синергически с IL-6 и активируя при этом IL-6 независимый путь сигнальной трансдукции [30; 38; 81].

Таким образом, IGF-1 регулирует пролиферацию и выживаемость клеток ММ, воздействуя на них как независимо, так и совместно с другими

факторами, и, такая взаимная кооперация усиливает действие каждого фактора в отдельности, и является важным в прогрессии ММ в целом.

Роль IGF-1 в возникновении лекарственной устойчивости при ММ

Длительность жизни больных, как было сказано выше, в основном зависит от чувствительности к лечению противоопухолевыми препаратами, среди которых алкилирующие соединения (мелфалан, циклофосамид, хлорбутин и другие), доксорубин, бортезомиб (велкейд) [7]. Со временем у многих больных ММ развивается устойчивость к самым разным химиопрепаратам, различающимся и по химической структуре, и по механизму действия. Иными словами, возникает множественная лекарственная устойчивость [2; 3]. Одним из хорошо охарактеризованных на сегодняшний день молекулярных механизмов МЛУ опухолей человека является повышенная активность белка Р-гликопротеина (Pgp), кодируемого геном *MDR1*. Pgp, используя энергию АТФ, транспортирует различные химиопрепараты из цитозоля и/или из плазматической мембраны во внеклеточное пространство [2; 3]. Предварительные исследования показали, что у нелеченных больных ММ экспрессия Pgp обнаруживается только в 1-2% образцов биопсий, тогда как у леченных больных, у которых возник рецидив и они стали нечувствительными к химиопрепаратам, экспрессия Pgp обнаруживается в 40–80% случаев [93].

Наряду с Pgp в МЛУ вовлечены также и другие известные на сегодняшний день белки: АТФ-зависимые транспортеры MRP1, BCRP, а также белок LRP [2; 3; 43].

Несмотря на то, что сегодня созданы различные классы ингибиторов, которые в основном являются конкурентами субстратов перечисленных выше белков-транспортеров, их действие в преодолении МЛУ пока недостаточно эффективно и в некоторых случаях такие ингибиторы вызывают сильные негативные побочные эффекты [43]. Поэтому наряду с дальнейшим совершенствованием уже имеющихся ингибиторов требуется поиск новых классов и типов ингибиторов МЛУ, которые были бы, с одной стороны, более эффективными, а с другой – универсальными для всех белков-транспортеров, и не имели бы негативных побочных эффектов. Вместе с тем, необходимо параллельно проводить фундаментальные исследования молекулярных механизмов регуляции экспрессии и активации самих белков МЛУ. Учитывая, что имеется несколько видов белков-транспортеров, не исключено, что они регулируются различным образом, и, возможно, что в их регуляции участвуют межклеточные взаимодействия, различные факторы роста, их рецепторы и активируемые ими сигнальные пути, мишенями которых являются промоторные и другие регуляторные регионы генов, кодирующих белки-транспортеры, участвующие в возникновении МЛУ.

В литературе имеются данные о том, что клетки ММ, проникая в микроокружение костного мозга, взаимодействуют с клетками стромы костного мозга (фибробластами) и белками внеклеточного матрикса приобретают лекарственную устойчивость, опосредованную клеточной адгезией (CAM-DR) [71]. Также показано, что взаимодействие клеток ММ с клетками стромы костного мозга активирует в последних транскрипцию и секрецию цитокинов и ростовых факторов, в том числе и инсулиноподоб-

ного фактора роста 1 типа (IGF-1). Последний, как было установлено, не только усиливает пролиферацию, выживание и миграцию клеток ММ, но также участвует в регуляции механизмов возникновения резистентности к общепринятым химиопрепаратам [71; 45]. Установлено, что клетки ММ, взаимодействуя с эндотелием кровеносных сосудов в микроокружении костного мозга, экспрессируют на своей поверхности рецептор IGF-1 [71]. Увеличение количества IGF-1R на поверхности клеток ММ приводит к большему количеству IGF-1/IGF-1R взаимодействий и последующей активации нижележащих сигнальных путей в клетке. В экспериментах *in vitro* было показано, что IGF-1R-зависимая активация PI3K-Akt сигнального пути предотвращает дексаметазон-индуцированный апоптоз и апоптоз, индуцированный бессывороточной средой [37; 76].

В недавней работе P. Maiso et al. также показали, что ингибирование тирозинкиназной активности IGF-1R усиливает действие леналидомида, дексаметазона, мелфалана и бортезомиба, а использование ингибитора тирозинкиназной активности IGF-1R совместно с дексаметазоном и бортезомибом заметно подавляет рост клеток ММ *in vitro* [66]. Кроме ингибирования апоптоза, известно и другое важное свойство IGF-1. Было показано, что в клетках рака толстой кишки мыши линии MCLM и в Т-лимфобластоидных клетках линии человека CCRF-CEM IGF-1 индуцировал экспрессию гена *MDR1* и значительно ингибировал гибель клеток от цитотоксических препаратов [41; 88]. В своей работе J. Ge et al. методом иммуногистохимии исследовали экспрессию *IGF-1R* и *MRP1* в 102 образцах больных раком желудка и обнаружили, что *IGF-1R* экспрессировался в 75,2 % случаев, а *MRP1* – в 69. Такая высокая степень корреляции в экспрессии этих генов, несмотря на химиотерапию, ассоциировалась с плохим прогнозом у больных раком желудка [36]. Другие авторы [55] в более ранней работе показали, что в клетках млекопитающих промоторы генов инсулина *IGF-1* и *MRP2* содержат сайты связывания с гепатоцитарными ядерными факторами HNF-1 α и HNF-1 β . Эти данные позволяют предположить, что экспрессия мРНК указанных генов может корегулироваться.

Роль IGF-1 и его рецепторов в регуляции экспрессии *MDR1* и других генов, ответственных за множественную лекарственную устойчивость при ММ, на сегодня не ясна, поэтому исследования в этом направлении являются актуальными в экспериментальной онкологии. Недавно в аспиратах костного мозга, полученных от больных ММ, нами была сопоставлена экспрессия двух изоформ мРНК гена инсулиноподобного фактора роста 1 типа *IGF-1A* и *IGF-1B* и мРНК генов рецепторов инсулиноподобного фактора роста 1 типа *IGF-1R*, *IR-A*, *IR-B* с экспрессией мРНК генов, ответственных за МЛУ, *MDR1*, *MRP1*, *LRP*, *BCRP*. мРНК генов МЛУ, за исключением *LRP*, экспрессировались у всех исследуемых больных ММ. Экспрессия мРНК генов системы IGF/инсулин различна и составила 21–68 %. В 80 % случаев у одних и тех же больных ММ наблюдается коэкспрессия изоформ мРНК *IGF-1A* и *IGF-1B*. Изоформы мРНК гена *IGF-1* (*IGF-1A* и *IGF-1B*) в подавляющем большинстве случаев экспрессировались в тех же образцах, в которых гиперэкспрессировались мРНК *MDR1* и *LRP*, причем, степень коэкспрессии изоформ мРНК *IGF-1* и мРНК *MDR1* составила 90 %, а изоформ мРНК *IGF-1* и мРНК *LRP* – 87,5 %. Мы продолжаем свои исследования в этом направлении *in vitro* на разных

типах линий клеток множественной миеломы. Наши предварительные данные, полученные на линии клеток ММ RPMI8226, однозначно показали, что транскрипция генов *MRP1* и *LRP* является регулируемой сигнальной системой, активируемой одной из комбинаций лиганд-рецепторных взаимодействий: IGF-1/IGF-1R или IGF-2/IGF-1R.

Остеолизис

Еще одним важным клиническим аспектом множественной миеломы является остеолизис. Известно, что в нормальной костной ткани поддерживается баланс между активностью остеобластов, участвующих в формировании костной ткани, и остеокластов, участвующих в резорбции костной ткани. При множественной миеломе этот баланс нарушен: количество и активность остеокластов выше, чем в норме, что приводит к резорбции кости. При исследовании молекулярных механизмов, лежащих в основе остеолизиса, были выявлены различные молекулы, участвующие в этом процессе. Одним из них, например, является воспалительный белок макрофага (MIP-1 α), который стимулирует хемотаксис предшественников остеокластов и участвует в созревании остеокластов, что связано с последующим остеолизисом [58; 68]. Другим, наиболее исследованным участником остеолизиса при ММ является система RANK-RANKL [111]. RANK, рецептор активатора NF- κ B, экспрессируется на поверхности предшественников остеокластов. RANKL, который является лигандом для RANK, экспрессируется на поверхности остеобластов, клеток стромы костного мозга, а также клетками миеломы [1; 111]. В результате связывания RANKL с рецептором RANK предшественники остеокластов дифференцируются в остеокласты, которые затем активируются и разрушают костную ткань (рис. 2). При ММ миеломные клетки, экспрессирующие на своей поверхности RANKL, могут непосредственно стимулировать созревание остеокластов в своем ближайшем окружении в костном мозге. Зрелые остеокласты, в процессе костной резорбции, экспрессируют IGF-1, который, в свою очередь, активирует размножение миеломных клеток [1]. Таким образом, образуется порочный круг, в котором, чем больше миеломных клеток, тем больше остеокластов, разрушающих кость, а чем больше остеокластов, тем больше IGF-1, который стимулирует размножение миеломных клеток.

Также имеется растворимая форма рецептора RANKL, остеопротегерин (OPG), который связывается с RANKL и, тем самым, негативно регулирует дифференцировку остеокластов и предотвращает резорбцию кости [21; 59; 90]. В экспериментах на мышах, больных множественной миеломой, было показано, что введение рекомбинантного OPG ингибирует дифференцировку остеокластов, предотвращает развитие остеолизиса и продлевает жизнь больным мышам [22; 102]. При ММ наблюдается супрессия продукции OPG, что приводит к дисбалансу между регуляторами физиологической костной резорбции OPG/RANKL [1; 111].

Заключение

Таким образом, данные, имеющиеся на сегодня в литературе, указывают на то, что система IGF/инсулин занимает особо важное место в биологии ММ. IGF-1 в высокой концентрации присутствует в микроокружении костного мозга и является одним из важных факторов, который имеет множе-

ственные функции в прогрессии ММ. Продуцируемый клетками стромы костного мозга IGF-1 является выраженным селективным агентом, привлекающим клетки миеломы в костный мозг. Как специфический хемоаттрактант для клеток миеломы он:

- притягивает мигрирующие по кровеносному руслу клетки миеломы к эндотелию сосудов,
- активирует в них экспрессию определенных молекул адгезии и протеаз, разрушающих различные компоненты внеклеточного матрикса и базальной мембраны,
- притягивая миеломные клетки, способствует их трансмиграции через стенки капилляров и базальную мембрану в микроокружение костного мозга.

Литература

1. Вотякова О.М., Демина Е.А. Множественная миелома. – Клиническая онкогематология. Руководство для врачей под редакцией профессора М.А. Волковой (Издание второе, переработанное и дополненное). – М.: «Медицина», 2007. – 42. – Стр. 847–873.
2. Ставровская А.А. Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная активностью транспортных белков клетки: некоторые новые факты и перспективы исследований // Биологические мембраны. – 2003. – 20(3). – С. 196–205.
3. Ставровская А.А. Опухолевая клетка в обороне // Соровский образовательный журнал. – 2001. – 7(7). – С. 17–23.
4. Шуианов С.С., Марына Л.Г., Черных Ю.Б. и др. Коэкспрессия мРНК генов систем IGF/инсулин и множественной лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой // Клиническая Онкогематология. – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 105–13.
5. Abound S.L., Bethel C.R., Aron D.C. Secretion of insulin like growth factor I and insulin like growth factor-binding proteins by murine bone marrow stromal cells // J. Clin. Invest. – 1991. – 88. – P. 470–5.
6. Adams T.E., Epa V.C., Garrett T.P. et al. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor // Cell Mol Life Sci. – 2000. – 57. – P. 1050–93.
7. Anderson C.K., Kyle R.A., Dalton W.S. et al. Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches // Hematology. – 2000. – 2000 (1). – P. 147–65.
8. Asosingh K., Gunthert U., Bakkus M.H. et al. In vivo induction of insulin like growth factor-I receptor and CD44v6 confers homing and adhesion to murine multiple myeloma cells // Cancer Res. – 2000. – 60. – P. 3096–104.
9. Barille S., Akhoundi C., Collette M. et al. Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of pro MMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells // Blood. – 1997. – 90. – P. 1649–55.
10. Barille S., Bataille R., Rapp M.J. et al. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation // J. Immunol. – 1999. – 163. – P. 5723–8.
11. Barton E.R. The ABCs of IGF-1 isoforms: impact of muscle hypertrophy and implications for repair. Appl. Physiol // Nutr. Metab. – 2006. – 31. – P. 791–7.
12. Baserga R., Rubin R. Cell cycle and growth control // Crit Rev Eukaryot Gene Expr. – 1993. – 3(1). – P. 47–61.
13. Baylink D.J., Finkelman R.D., Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation // J Bone Miner Res. – 1993. – 8(Suppl 2). – S565–72.
14. Bellacosa A., Testa J.R., Stall S.P. et al. A retroviral oncogene akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH-2-like region // Science. – 1991. – 254. – P. 254–77.
15. Bergsagel D.E., Wong O., Bergsagel P.L. Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence // Blood. – 1999. – 94(4). – P. 1174–82.
16. Caligaris-Cappio F., Bergui L., Gregoretti M.G. et al. Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma // Blood. – 1991. – 77. – P. 2688–93.
17. Chen C., Edelstein L.C., Gelinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl(x)L // Mol Cell Biol. – 2000. – 20. – P. 2687–95.
18. Chenu C., Valentin-Opran A., Chavassieux P. et al. Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)2D3 and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures // Bone. – 1990. – 11. – P. 81–6.
19. Coppola D., Ferber A. et al. A functional insulin-like growth factor 1 receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor // Mol Cell Biol. – 1994. – 14 (7). – P. 4588–99.
20. Cross D.A., Alessi D.R., Vandenheede J.R. et al. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor-1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cell between Ras and Raf // Biochem J. – 1994. – 303 (Pt1). – P. 12–26.
21. Croucher P.I., Shipman C.M., Lippitt J. et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma // Blood. – 2001. – 98. – P. 3534–40.
22. Croucher P.I., De Hendrik R., M.J. Perry M.J. et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival // J. Bone Miner. Res. – 2003. – 18. – P. 482–92.
23. Curran S., Murray G.I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis // J. Pathol. – 1999. – 189. – P. 300–8.
24. Datta S.R., Dudek H., Tao X. et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery // Cell. – 1997. – 91. – P. 231–41.
25. De Meyts P., Urso B., Christoffersen C.T. et al. Mechanism of insulin and IGF-1 receptor activation and signal transduction specificity. Receptor dimer cross-linking, bell-shaped curves and sustained versus transient signaling // Ann NY Acad Sci. – 1995. – 766. – 388–401.
26. DeAngelis T., Ferber A. et al. A functional insulin-like growth factor 1 receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet derived growth factor receptor // J Cell Physiol. – 1995. – 164(1). – P. 214–21.
27. Drach J., Ackermann J., Fritz E. et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy // Blood. – 1998. – 92(3). – P. 802–9.
28. Drach J., Kaufmann H. // Ann. Oncology. – 2002. – 13 (Suppl. 4). – P. 43–6.
29. Ellis M.J., Leav B.A., Yang Z. et al. Affinity for the insulin-like growth factor-II (IGF-II) receptor inhibits autocrine IGF-II activity in MCF-7 breast cancer cells // Mol Endocrinol. – 1996. – 10. – P. 286–97.

В микроокружении костного мозга IGF-1 проявляет в клетках ММ антиапоптотический эффект, придавая злокачественным клеткам преимущество в борьбе за выживание, а также стимулирует их к пролиферации и продукции ими факторов роста эндотелия сосудов, и тем самым, активирует нежелательный ангиогенез. IGF-1 в сочетании с другими цитокинами и факторами роста может влиять на прогрессию ММ, что проявляется в усилении пролиферации, выживаемости и возникновении лекарственной устойчивости клеток ММ.

Изучение роли системы IGF/инсулин при миеломе на сегодня является одним из приоритетных направлений экспериментальной онкологии, способствующих более глубокому пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе прогрессии ММ.

30. Ferlin M., Noraz N., Hertogh C. Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway // Br J Haematol. – 2000. – 111. – P. 626–34.
31. Frame S., Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery // Biochem J. – 2001. – 359. – P. 1–16.
32. Frasca F., Pandini G., Scalia P. et al. Insulin receptor isoform A a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells // Mol Cell Biol. – 1999. – 19. – P. 3278–88.
33. Freund G.G., Kulas D.T., Mooney R.A. Insulin and IGF-1 increase mitogenesis and glucose metabolism in the multiple myeloma cell line, RPMI 8226 // J. Immunol. – 1993. – 151. – P. 1811–20.
34. Fu H., Subramanian R.R., Masters S.C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation // Annu Rev Pharmacol Toxicol. – 2000. – 40. – P. 617–47.
35. Gallagher E.J., LeRoith D. Minireview: IGF, Insulin, and Cancer // Endocrinology. – 2011. – 152. – P. 2546–51.
36. Ge J., Chen Z., Wu S. et al. Expression Levels of Insulin-Like Growth Factor-1 and Multidrug Resistance-Associated Protein-1 Indicate Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer // Digestion. – 2009. – 80. – P. 48–158.
37. Ge N.L., Rudikoff S. Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth // Blood. – 2000. – 96. – P. 2856–61.
38. Georgii-Hemming P., Wiklund H.J., Ljunggren O. et al. Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines // Blood. – 1996. – 88. – P. 2250–8.
39. Goodwin P.J., Ennis M., Pritchard K.I. et al. Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study // J. Clin. Oncol. – 2002. – 20. – P. 42–51.
40. Grimes C.A., Jope R.S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. Prog Neurobiol // 2001. – 65. – P. 391–426.
41. Guo Y.S., Jin G.F., Houston C.W. et al. Insulin-like growth factor-1 promotes multidrug resistance in MCLM colon cancer cells // J Cell Physiol. – 1998. – 175(2). – P. 141–8.
42. Hartog H., Wesseling J., Boezeng H.M. et al. The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: Old focus, new future // EJC. – 2007. – 43. – P. 1895–904.
43. Hatok J., Račay P., Hudeček J., et al. Genes of multidrug resistance in haematological malignancies // Biologia, Bratislava. – 2006. – 61(3). – P. 247–56.
44. Hernandez-Sanchez S., Werner H. et al. Differential regulation of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor gene expression by IGF-1 and basic fibroblastic growth factor // Biol Chem. – 1997. – 272(8). – P. 4663–70.
45. Hideshima T., Bergsagel P.L., Kuehl W.M. et al. Advances in Biology of Multiple Myeloma: Clinical Applications // Blood. – 2004. – DOI 10.1182/blood. – 2004.-01-0037. For personal use only.
46. Hideshima T., Nakamura N., Chauhan D. et al. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma // Oncogene. – 2001. – 20. – P. 5991–6000.
47. Hoeflich K.P., Luo J., Rubie E.A. et al. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation // Nature. – 2000. – 406. – P. 86–90.
48. Hsu J.H., Shi Y., Hu L. et al. Role of the AKT kinase in expansion of multiple myeloma clones: effects on cytokine-dependent proliferative and survival responses // Oncogene. – 2002. – 21. – P. 1391–400.
49. Jaffe E.E., Harris N., Stein H. et al. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues – Lyon: IRC Press. – 2001. – P. 351.
50. Jones J.I. and Clemmons D.R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions // Endocrine Reviews. – 1995. – 16. – P. 3–34.
51. Jones J.I., Clemmons D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions // Endocr. Rev. – 1995. – 16. – P. 3–34.
52. Kelly T., Borset M., Abe E. et al. Matrix metalloproteinases in multiple myeloma // Leuk. Lymphoma. – 2000. – 37. – P. 273–81.
53. Khandwala H.M., McCutcheon I.E., Flyvbjerg A. et al. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth // Endocr Rev. – 2000. – 21. – P. 215–44.
54. Kiess W., Blickenstaff G.D., Sklar M.M. et al. Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor // J. Biol Chem. – 1988. – 263. – P. 9339–44.
55. Kitataka S., Sato U., Igarashi T. Regulation of human insulin, IGF-I, and multidrug resistance protein 2 promoter activity by hepatocyte nuclear factor (HNF)-1b and HNF-1a and the abnormality of HNF-1b mutants // Journal of Endocrinology. – 2007. – 192. – P. 141–7.
56. Kreuz S., Siegmund D., Scheurich P. et al. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling // Mol Cell Biol. – 2001. – 21. – P. 3964–73.
57. Kuehl M., Cultaro C., Dib A. et al. Ig translocations, cyclin D dysregulation, and other genetic events in multiple myeloma // Hematol. J. – 2003. – 4 (Suppl. 1). – P. 16.
58. Kukita T., Nomiyama H., Ohmoto Y. et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment // Lab. Invest. – 1997. – 76. – P. 399–406.
59. Lacey D.L., Timms E., Tan H.L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation // Cell. – 1998. – 93. – P. 165–76.
60. Le Roith D., Bondy C., Yakar S. et al. The Somatomedin Hypothesis // Endocr. Rev. – 2001. – 22. – P. 53–74.
61. Leibiger B., Leibiger I.B., Moede T. et al. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic b cells // Molecular Cell. – 2001. – 7. – P. 559–70.
62. Leppert D., Waubant E., Galaray R. et al. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro // J. Immunol. – 1995. – 154. – P. 4379–89.
63. LeRoith D., Roberts C.T.Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. Cancer Letters // 2003. – 195. – P. 127–37.
64. Lokhorst H.M., Lamme T., De Smet M. et al. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures // Blood. – 1994. – 84. – P. 2269–77.
65. Ludwig T., Eggenschwiller J., Fisher P. et al. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in igf2 and igf-1r null backgrounds // Dev Biol. – 1996. – 177. – P. 517–35.
66. Maiso P., Ocio E.M., Garayoa M., et al. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells // BJH. – 2008. – 141. – P. 470–82.
67. Masters S.C., Fu H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal // J Biol Chem. – 2001. – 276. – P. 45193–200.
68. Menten P., Wuyts A., Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1 // Cytokine Growth Factor Rev. – 2002. – 13. – P. 455–81.
69. Menu E., Braet F., Timmers M. et al. The F-actin content of multiple myeloma cells as a measure of their migration // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2002. – 973. – P. 124–34.
70. Mira E., Manes S., Lacalle R.A. et al. Insulin-like growth factor I-triggered cell migration and invasion are mediated by matrix metalloproteinase-9 // Endocrinology. – 1999. – 140. – P. 1657–64.
71. Mitsiades C.S., Mitsiades N., Kung A.L. et al. The IGF/IGF-1R system is a major therapeutic target for multiple myeloma, other hematologic malignancies and solid tumors // Blood. – 2002. – P. 100–170a.
72. Moxham C.P., Duronio V., Jacobs S. et al. Insulin-like growth factor 1 receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor 1 and insulin receptor heterodimers // J Biol Chem. – 1989. – 264. – P. 13238–44.

73. Navarro M., Baserga R. Limited redundancy of survival signals from the type 1 insulin-like growth factor receptor // *Endocrinology*. – 2001. – 142. – P. 1073–81.
74. Nilsson K., Georgii-Hemming P., Spets H. et al. The control of proliferation, survival and apoptosis in human multiple myeloma cells in vitro // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 1999. – 246. – P. 325–32.
75. Noel A., Gilles C., Bajou K. et al. Emerging roles for proteinases in cancer // *Invasion Metastasis*. – 1997. – 17. – P. 221–39.
76. Ogawa M., Nishiura T., Oritani K. et al. Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line // *Cancer Res*. – 2000. – 60. – P. 4262–9.
77. Oh Y. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF-binding proteins // *Breast Cancer Res Treat*. – 1998. – 47. – P. 283–93.
78. Pandini G., Frasca F., Mineo R. et al. Insulin/insulin-like growth factor 1 hybrid receptor have different biological characteristics depending on insulin receptor isoform involved // *J Biol Chem*. – 2002. – 277. – P. 39684–95.
79. Pap M., Cooper G.M. Role glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway // *J Biol Chem*. – 1998. – 273. – P. 19929–32.
80. Pietrzkowski Z., Lammers R. et al. Constitutive expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor abrogates all requirements for exogenous growth factors // *Cell Growth Differ*. – 1992. – 3(4). – P. 199–205.
81. Qiang Y.W., Kopantzev E., Rudikoff S. et al. Insulin like growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk // *Blood*. – 2002. – 99. – P. 4138–46.
82. Qiang Y.W., Yao L., Tosato G. et al. Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells // *Blood*. – 2004. – 103. – P. 301–8.
83. Raab M.S., Podar K., Breitkreutz I. et al. Multiple myeloma // *Lancet*. – 2009. – 374. – P. 324–39.
84. Rubin R., Baserga R. Insulin-like growth factor -1 receptor: Its role in cell proliferation, apoptosis, tumorigenicity // *Lab Invest*. – 1995. – 73(3). – P. 311–31.
85. Rubini M., Werner H. et al. Platelet-derived growth factor increases the activity of the promotor of the insulin-like growth factor -1 (IGF-1) receptor gene // *Exp Cell Res*. – 1994. – 211(2). – P. 374–9.
86. Sacco A., Morcavallo A., Pandini G. et al. Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A // *Endocrinology*. – 2009. – 150. – P. 3594–602.
87. Samani A.A., Yakar S., LeRoith D. et al. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights // *Endocrine Reviews*. – 2007. – 28. – P. 20–47.
88. Schwarze C.P., Neu S., Beck J. et al. Influence of IGF-I and Cell Density on MDR1 Expression in the T-Lymphoblastoid Cell Line CCRF-CEM // *Horm Res*. – 1999. – 52. – P. 192–9.
89. Sciacca L., Costantino A., Pandini G. et al. Insulin receptor activation by IGF-2 in breast cancers: evidence for new autocrine/paracrine mechanism // *Oncogene*. – 1999. – 18. – P. 2471–9.
90. Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density // *Cell*. – 1997. – 89. – P. 309–19.
91. Singleton J.R., Dixit V.M., Feldman E.L. et al. Type I insulin-like growth factor receptor activation regulates apoptotic proteins // *J Biol Chem*. – 1996. – 271. – P. 31791–4.
92. Somervaille T.C., Linch D.C., Khwaja A. Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and BAX // *Blood*. – 2001. – 98. – P. 1374–81.
93. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies // *J. Int. Med*. – 2000. – 247. – P. 521–34.
94. Spets H., Georgii-Hemming P., Siljason J. et al. Fas/APO-1 (CD95)-mediated apoptosis is activated by interferon-gamma and interferon-interleukin-6 (IL-6)-dependent and IL-6-independent multiple myeloma cell lines // *Blood*. – 1998. – 92. – P. 2814–23.
95. Sprynski A.C., Hose D., Kassambara A. et al. Insulin is a potent myeloma cell growth factor through insulin/IGF-1 hybrid receptor activation // *Leukemia*. – 2010. – 24. – P. 1940–50.
96. Tai Y.T., Podar K., Catley L. et al. Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3V-kinase/AKT signaling // *Cancer Res*. – 2003. – 63. – P. 5850–8.
97. Tu Y., Gardner A., Lichtenstein A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses // *Cancer Res*. – 2000. – 60. – P. 6763–70.
98. Uchiyama H., Barut B.A., Mohrbacher A.F. et al. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion // *Blood*. – 1993. – 82. – P. 3712–20.
99. Van Riet I., Vande Broek I., Asosingh K. et al. Endothelial cell-tumor cell interactions in multiple myeloma // *Hematol. J*. – 2003. – 4 (Suppl. 1). – P6.3 (abstract).
100. Vanderkerken K., Asosingh K., Braet F. et al. Insulin-like growth factor-1 acts as a chemoattractant factor for 5T2 multiple myeloma cells. *Blood* // 1999. – 93. – P. 235–41.
101. Vanderkerken K., De Greef C., Asosingh K. et al. Selective initial in vivo homing pattern of 5T2 multiple myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse // *Br. J. Cancer*. – 2000. – 82. – P. 953–9.
102. Vanderkerken K., De Leenheer E., Shipman C. et al. Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma // *Cancer Res*. – 2003. – 63. – P. 287–9.
103. Vanderkerken K., De Raeve H., Goes E. et al. Organ involvement and phenotypic adhesion profile of 5T2 and 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse // *Br. J. Cancer*. – 1997. – 76. – P. 451–60.
104. Weber J.D., Kuo M.L., Bothner B. et al. Cooperative signals governing ARF mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex // *Mol. Cell. Biol*. – 2000. – 20. – P. 2517–28.
105. Willis T.G., Dyer M.J. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies // *Blood*. – 2000. – 96(3). – P. 808–22.
106. Xu F., Gardner A., Tu Y. et al. Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors // *Br. J. Haematol*. – 1997. – 97. – P. 429–40.
107. Yamaguchi Y., Flier J.S., Yokota A. et al. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells // *Endocrinology*. – 1991. – 129. – P. 2058–66.
108. Yang E., Korsmeyer S.J. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death // *Blood*. – 1996. – 88. – P. 386–401.
109. Yu H., Rohan T. Role of insulin-like growth factor family in cancer development and progression // *J Natl Cancer Inst*. – 2000. – 92. – P. 1472–89.
110. Zhang B., Fenton R.G. Proliferation of IL-6-independent multiple myeloma does not require the activity of extracellular signal-regulated kinases (ERK-1/2) // *J Cell Physiol*. – 2002. – 193. – P. 42–54.
111. Menu E., Asosingh K., Van Riet I. et al. Myeloma cells (5TMM) and their interactions with the marrow microenvironment // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2004. – 33. – P. 111.
112. Catlett-Falcone R., Landowski T.H., Oshiro M.M. et al. Constitutive activation of Stat-3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells // *Immunity*. – 1999. – 10. – P. 105–15.
113. Chu Z.L., McKinsey T.A., Liu L. et al. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1997. – 94. – P. 10057–62.

УДК 615.5-006.81-071:575.113

П.А. Черненко^{1,2}, С.Б. Петерсон², Л.Н. Любченко¹**НАСЛЕДСТВЕННАЯ МЕЛАНОМА КОЖИ: КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА**¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва²ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России, Москва**Контактная информация:**

Любченко Людмила Николаевна д-р. мед. наук, заведующая лабораторией клинической онкогенетики НИИ клинической онкологии

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24; тел. +7(495)324-26-85

e-mail: clingen@mail.ru

Статья поступила 16.04.2012, принята к печати 31.08.2012.

Резюме

Меланома кожи (МК) является этиологически гетерогенным заболеванием, его развитие связано с влиянием как средовых, так и генетических факторов. Большая часть случаев наследственной МК ассоциирована с мутациями в генах предрасположенности с различной пенетрантностью (*CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R*, *XPA* и др.). В обзоре представлены современные клинико-генетические аспекты МК, касающиеся рисков развития заболевания, ДНК-диагностики генов, вовлеченных в канцерогенез МК, частотного спектра мутаций, имеющих популяционную зависимость, клинико-молекулярных корреляций и методов профилактики.

Ключевые слова: наследственная меланома кожи, спорадическая меланома кожи, гены *CDKN2A*, *CDK4*.P.A. Chernenko^{1,2}, S.B. Peterson², L.N. Lyubchenko¹**HEREDITARY CUTANEOUS MELANOMA: CLINICAL AND MOLECULAR DIAGNOSTICS**¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» of RAMS, Moscow²N.I. Pirogov Russian State Medical University, Moscow**Abstract**

Cutaneous malignant melanoma (CMM) is an etiologically heterogeneous disease, its development is caused by both environmental and genetic factors. Most cases of hereditary CMM is associated with mutations in high penetrance susceptibility genes (*CDKN2A*, *CDK4*), as well as mutations in low penetrance susceptibility genes (*MC1R*, *XPA*, etc.). The paper is devoted to the problem of hereditary CMM, to characterization of the major genes responsible for predisposition to this disease, as well as to understanding how genetic changes in aforementioned genes influence the melanoma risk and clinical features of CMM in a modern context.

Key words: hereditary cutaneous malignant melanoma, sporadic cutaneous malignant melanoma, genes *CDKN2A*, *CDK4*.**Введение**

Развитие злокачественных новообразований ассоциировано с рядом генетических перестроек. Накопление мутаций и эпигенетических нарушений влияет на работу генов, контролирующих ключевые признаки злокачественности (пролиферацию, инвазию, ангиогенез, подавление апоптоза, метастазирование и т.д.). К структурно-функциональным перестройкам и нарушениям эпигенетической регуляции экспрессии генов относятся активирующие мутации в онкогенах, инактивирующие мутации в генах-супрессорах опухолевого роста, а также гипер- и гипометилирование промоторов генов. Молекулярно-генетические исследования в области онкологии являются основой для разработки современных подходов к диагностике, лечению и профилактике злокачественных новообразований.

Меланома кожи (лат. *melanoma*, др.-греч. μέλας – «чёрный») – злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов – пигментных клеток, продуцирующих меланин. МК является крайне агрессивным заболеванием, характеризующимся склонностью к быстрому распространению процесса и парадоксальной устойчивостью к большинству применяемых методов лечения, в связи с чем, несомненно, является объектом для детального изучения с применением высокотехнологичных методов.

Заболеваемость меланомой кожи

По данным разных авторов в структуре онкологической заболеваемости МК составляет 1–3 % и не превышает 10 % среди всех злокачественных новообразований кожи. При этом на долю МК приходится до 80 % летальных исходов от злокачественных новообразований кожи [2; 6].

Рост заболеваемости МК отмечен практически во всех регионах мира и за последние 40 лет составил примерно 5% в год [74]. В 2008 г. в США диагностировано 62 000 больных МК [4]. В России в 2007 г. зарегистрировано 7732 вновь выявленных случаев МК. Показатели заболеваемости составляют 3,6 случаев на 100 000 мужчин и 4,2 случая на 100 000 женщин. С 2002 по 2007 г. прирост абсолютного числа заболевших составил 17 %. В большинстве регионов России у женщин МК встречается чаще, чем у мужчин. Максимальные стандартизованные показатели заболеваемости МК в 2007 г. зарегистрированы в Камчатской области: 6,3 на 100 000 мужчин и 7,6 на 100 000 женщин; в Карелии: 5,2 и 6,7 на 100 000; Санкт-Петербурге: 4,6 и 6,7 на 100 000; минимальные – у лиц обоего пола в Хакасии, Дагестане, Кабардино-Балкарии, Чувашии, Калмыкии, а также у мужчин в Якутии: 0,9–2,1 на 100 000.

В структуре онкологической заболеваемости нашей страны смертность от данной патологии со-

ставляет 1,8 на 100 000 мужчин и 1,4 на 100 000 женщин. С 2002 по 2007 гг. был отмечен рост смертности мужского населения от МК, который достиг 20%. При этом МК заняла первое место по приросту смертности у женщин (16,7%) [1].

Примерно в 5–14 % случаев МК является наследственной [25]. В США мутации в одном из генов (*CDKN2A/p16*), ответственных за предрасположенность к развитию МК, являются причиной 1400–2800 новых случаев МК каждый год.

История изучения меланомы кожи

Доказательства существования МК в древности подтверждают палеопатологи, которые обнаружили диффузное поражение костей и округлые меланоцитарные массы в коже перуанских мумий IV столетия н.э. [77]. Первое описание меланомы встречается в трудах Гиппократов, назвавшего ее «смертельной черной болезнью» (V век н.э.).

Никакой убедительной информации в течение последующих почти полутора тысяч лет в литературе не встречается, вплоть до XVII–XVIII веков, когда европейские исследователи описали это заболевание как «смертельную черную опухоль с метастазами и черной жидкостью в теле» [14]. И только в 1804 году французский врач René Laennec, будучи еще студентом, выступил с докладом, посвященным данной проблеме, на медицинском факультете Парижского университета, а в 1805 году опубликовал труд «*Le melanose*», в котором дал детальную характеристику этого заболевания [44].

Врач общей практики W. Norris, изучавший МК, предположил, что она может иметь наследственную природу и в 1820 г. издал рукопись, посвященную описанию семьи с многочисленными атипичными невусами, а также характеристике семей с наличием метастатических поражений [57]. И, наконец, в 1838 году R. Carswell впервые использовал медицинский термин «меланома» по отношению к злокачественному пигментному поражению кожи [77]. Развитие молекулярной генетики в течение последних 20 лет подтвердило теорию W. Norris о существовании генетически детерминированной меланомы, а описанный доктором клинический случай теперь рассматривается в рамках синдрома множественных диспластических невусов, ассоциированного с меланомой (FAMMM-синдром). В последующем, в 1992 году, с развитием молекулярно-биологических технологий в семьях с FAMMM-синдромом были идентифицированы герминальные мутации в *CDKN2A* [32; 50].

Наследственная предрасположенность к меланоме кожи

МК является этиологически гетерогенным заболеванием, его развитие связано с воздействием как средовых, так и генетических факторов.

Среди всех факторов риска развития МК определяющее значение имеет взаимосвязь между генетически детерминированным кожным фенотипом и УФ-облучением. Однако, расположение многих очагов меланомы на участках кожи, не подвергающихся регулярной солнечной экспозиции, свидетельствует о том, что эта связь не является специфической.

Выделяют *спорадическую и наследственную* формы МК [8]. Если в семье пациента отсутствуют случаи заболевания данной патологией, речь идет о спорадической (90 % всех случаев) форме. В тех случаях, когда имеет место накопление случаев МК в семье, МК называют (семейной, генетически-

ассоциированной) *наследственной* (5–14 %). В этом случае заболевание обусловлено герминальными мутациями в генах предрасположенности с возможностью наследования структурных перестроек последующими поколениями в соответствии с классическими законами Менделя [29; 46]. Установлено, что наличие семейной истории МК увеличивает риск развития опухоли у здоровых членов семьи.

По данным литературы, частота МК у близких родственников больных данной патологией составляет от 8 до 14 %.

Речь о семейной истории МК идет в том случае, если поражены два и более родственника первой степени родства [69] или у троих членов семьи диагностирована (независимо от степени родства) МК [5; 75]. Семейное накопление МК также отмечается в 5–10 % случаев в географических регионах с высоким уровнем заболеваемости МК [75].

На основании проведенных многочисленных исследований были установлены основные клинические критерии семейной МК:

1. ранний возраст возникновения заболевания: медиана возраста манифестации составляет 36 лет у мужчин и 29 лет у женщин при наследственной форме по сравнению с 57 годами у мужчин и 59 годами у женщин при спорадической форме. В 10 % случаев семейная МК диагностируется в возрасте 20 лет, тогда как спорадические случаи МК выявляются в этом возрасте лишь в 2 % случаев [8];
2. наличие большого количества пигментных невусов на коже;
3. первично-множественные очаги поражения МК: частота первично-множественной МК составляет 30 % при наследственной по сравнению с 4 % при спорадической МК [8].

По клиническим, фенотипическим и гистологическим параметрам семейная МК не отличается от спорадической, тогда как ранний возраст манифестации и множественный характер поражения встречаются чаще именно при наследственной форме [42].

В течение последних десятилетий усилия ученых направлены на установление молекулярно-генетических перестроек, лежащих в основе развития МК. С использованием сегрегационного анализа и сравнительной геномной гибридизации были картированы гены, вовлеченные в наследственный и спорадический канцерогенез МК, такие как *CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R*, *BRAF*, *NRAS*, *c-KIT*, *PTEN* и др.

Гены, ответственные за развитие семейной формы МК, разделяют на 2 большие группы: гены с высокой пенетрантностью и гены с низкой пенетрантностью.

Высокопенетрантные гены

Ген *CDKN2A* (p16/INK4A/*CDKN2A*/Multi Tumor-Suppressor MTS1/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (9p21) (OMIM № 600160). Превалирующее значение в развитии наследственной формы МК принадлежит *CDKN2A*, мутации которого наблюдаются, по данным разных авторов, в 20–50 % случаев, особенно в семьях, в которых у троих и более лиц диагностирована МК [40; 60].

Ген *CDKN2A* принадлежит к семейству генов-супрессоров опухолевого роста и относится к группе «хранителей клеточного цикла». Он расположен на коротком плече 9-ой хромосомы и состоит из четырех экзонов: 1а, 1б, 2 и 3 [18].

Этот ген кодирует два разных белка P16Ink4A (экзоны 1α, 2 и 3) и P14ARF (экзоны 1β, 2 и 3), посредством которых влияет на два сигнальные пути, отвечающих за регуляцию клеточного цикла: p53 (TP53, OMIM № 191170) и Rb1 (OMIM № 614041) (рис. 1-2) [27].

Герминальные мутации в одном из двух аллелей *CDKN2A* ассоциированы с наследственной предрасположенностью к развитию МК. Часть из этих мутаций инактивирует только *CDKN2A/P16*, не нарушая функцию *CDKN2A/P14ARF*.

Частота мутаций гена *CDKN2A*, как и заболеваемость МК, варьирует в различных географических регионах – отмечаются более низкие показатели в Европе по сравнению с Северной Америкой. В противовес этому А.М. Goldstein et al. провели сравнительный анализ результатов многочисленных исследований в разных странах мира с оценкой количества семей и пациентов с МК – носителей мутации *CDKN2A* [19]. В общей сложности было оценено 385 семей, в каждой из которых было выявлено ≥ 3 больных МК (всего 1720 пациентов). Мутации *CDKN2A* были обнаружены у представителей 39 % семей (n=150). Частота мутаций варьировала от 20 (32/162) в Австралии до 45 % (29/65) в Северной Америке и 57 % (89/157) в Европе. Примечательно, что низкая частота мутаций гена *CDKN2A* – 20 % – наблюдалась в Австралии, регионе с наиболее высокими показателями заболеваемости – 38,5 на 100 000 мужчин; 29,5 на 100 000 женщин, что в свою очередь подтверждает теорию об определяющей роли УФ-радиации. В то же время наиболее высокая частота мутаций наблюдалась в Европе (57 %), регионе с относительно низкими показателями заболеваемости (7,3/100 000 среди мужчин; 10/100 000 среди женщин). Результаты, по мнению авторов, связаны с различным сочетанием индивидуальных, генетических, семейных и внешнесредовых факторов риска.

По данным проведенного [9] международно-го исследования семей,отягощенных МК, носители мутаций *CDKN2A/P16* имели значительно повышенный риск развития МК, равный 58 % в Великобритании, 76 % в США и 91 % в Австралии. И хотя жители Англии и Австралии схожи генетически, уровни УФ-экспозиции в этих регионах совершенно разные, что может обуславливать различную пенетрантность мутаций *CDKN2A/P16* в английских и австралийских семьях.

CDKN2A/P16/INK4A/MTS1 играет важную роль в процессе канцерогенеза. У мышей с отсутствием экспрессии *CDKN2A/P16* в раннем возрасте часто развиваются фибросаркомы и лимфомы, а также повышена чувствительность к канцерогенам [67].

Белок p16 – ингибитор циклин-зависимых киназ – является участником сигнального пути Rb/cyclinD/cdk4/p16INK4a [15]. Связываясь с киназами cdk4/6, p16 нарушает их взаимодействие с циклином D [65]. Ингибирование функций циклин-зависимых киназ приводит к гипофосфорилированию белка pRB, что снижает экспрессию E2F-зависимых генов. В результате блокируется переход клетки из фазы G₁ в фазу S [41; 49; 67], осуществляя контроль клеточного деления и пролиферации (рис. 3).

МК, ассоциированная с мутациями в гене *CDKN2A/P16*, имеет аутосомно-доминантный тип наследования. Вероятность передачи в соответствии с законами Менделя мутаций гена *CDKN2A/P16* детям составляет 50 %. Более половины герминальных мутаций *CDKN2A/P16*, ответственных за развитие

генетически-ассоциированной МК, представляют собой миссенс-мутации, а также часто встречаются делеции и мутации со сдвигом рамки считывания (рис. 3 а–б).

Спектр злокачественных новообразований, наблюдающихся в семьях с мутациями в *CDKN2A/P16*, включает как спорадическую, так и семейную формы МК, рак поджелудочной железы, увеальную меланому, астроцитому и, по некоторым данным, рак молочной железы. Отмечено также участие этого гена в развитии глиомы, рака легких, Т-клеточного и В-клеточного лейкозов. Имеются данные, что у носителей мутаций в гене *CDKN2A/P16* риск развития рака поджелудочной железы повышен в 13–22 раз [61].

Частота мутаций *CDKN2A/P16* возрастает с увеличением количества членов семьи, больных МК. При наличии в одной семье двух родственников с МК частота обнаружения мутаций составляет около 5 %, тогда как в семьях, в которых у шести и более членов диагностирована МК частота превышает 50% (табл. 1).

Примерно у 9–15 % пациентов с первично-множественной МК обнаруживают герминальные мутации, хотя их семейный анамнез не отягощен [22] (табл. 2). Эти данные позволяют предположить, что семейный анамнез МК не является достоверным маркером наличия мутации гена *CDKN2A*. По данным J Hashemi et al. количество первично-множественных МК у носителей герминальных мутаций *CDKN2A* была значительно выше, чем у пациентов с данным геном «дикого» типа [31]. Авторами был сделан вывод, что мутационный скрининг на наличие герминальных мутаций *CDKN2A* у пациентов с первично-множественной МК должен быть включен в алгоритм клинико-генетической диагностики. Наряду с этим имеется необходимость внедрения профилактических программ, направленные на снижение риска развития МК у членов семей пациентов с множественной МК.

В этой же работе [31] было проведено исследование ДНК 80 пациентов из Швеции с первично-множественной МК при помощи SSCP-анализа в сочетании с секвенированием на наличие герминальных мутаций всей кодирующей части *CDKN2A* (табл. 3). У девяти (11 %) пациентов были обнаружены герминальные мутации. Для части из них было показано клиническое значение. В 66,7 % (у 6 из 9 пациентов) выявлена мутация 113insR во 2 экзоне гена, которая была зарегистрирована ранее в семьях пациентов с МК из Стокгольма и южной части Швеции. Для этой мутации показана сегрегация с накоплением МК в семьях и функциональная значимость. У одного больного была обнаружена ранее не описанная мутация ins28T в 1 экзоне, которая приводит к сдвигу рамки считывания и стоп-сигналу в кодоне 43, в результате образуется нефункциональный белковый продукт с измененной последовательностью. Также в одном случае была выявлена ранее не описанная делеция 24 пар оснований, затрагивающая 62–69 кодоны 2 экзона *CDKN2A*. В результате проведения анализа *in vitro* было продемонстрировано, что данная делеция является функционально значимой. И, наконец, у одного пациента была обнаружена единичная нуклеотидная замена 214C/T в некодирующей части 5'-конца. На настоящий момент данные о ее функциональном значении отсутствуют. Тем не менее, авторы считают, что эта замена не является полиморфизмом, поскольку не была зарегистрирована ни в одном из ~ 300 исследованных на наличие структурных перестроек *CDKN2A* образцов крови.

Таблица 1

Вероятность наличия мутации *CDKN2A/P16* [34; 39; 53]

Фактор риска	Вероятность наличия мутации <i>CDKN2A/P16</i>
Лица, имеющие первично-множественную меланому	15 %
Лица, у которых два родственника первой степени родства поражены меланомой	5 %
Семьи, в которых у шести и более членов диагностирована меланома	> 50%

Таблица 2

Частота мутаций *CDKN2A/P16* у пациентов с первично-множественной МК [32]

Исследование	n пациентов	В т.ч.	
		с мутациями (%)	с мутациями, имеющих семейную историю МК
<i>Monzon et al. (1998)</i>	33	5 (15%)	3
<i>MacKie et al. (1998)</i>	17	2 (12%)	0
<i>Hashemi et al. (2000)</i>	80	8 (10%)	7
<i>Auroy et al. (2001)</i>	100	9 (9%)	0

Таблица 3

Герминальные нарушения *CDKN2A/P16* у лиц с первично-множественной меланомой кожи [31]

Локализация		Структурные изменения	Клиническое значение	n пац.	n пациентов с семейной историей меланомы
Промотор	Некодирующий регион	214C/T – замена	Неизвестно	1	0
Экзон 1	Кодон 28	Ins28T – вставка	Да (?)	1	0
Экзон 2	Кодон 62–69	del62–69 – делеция	Да	1	1
	Кодон 113	113insR – вставка	Да	6*	6
	Кодон 148	A148T – замена (полиморфный вариант)	Нет	7*	1

*У одного пациента были выявлены мутация 113insR и полиморфный вариант A148T.

Таблица 4

Происхождение некоторых ключевых герминальных мутаций в *CDKN2A/P16* [32]

Исследование	Мутация	Основная популяция	Происхождение
<i>Gruis et al. (1995)</i>	'p16-Leiden'*	Нидерланды	Голландцы
<i>Borg et al. (1996)</i>	insR113	Юг Швеции	Шведы
<i>MacKie et al. (1998)</i>	M53I	Шотландия	Шотландцы
<i>Liu et al. (1999)</i>	G-34T**	Канада	Британцы
<i>Ciotti et al. (2000)</i>	G101W	Лигурия (Италия)	«Кельты»
<i>Goldstein et al. (2001)</i>	V126D	Северная Америка	Немцы/Англичане

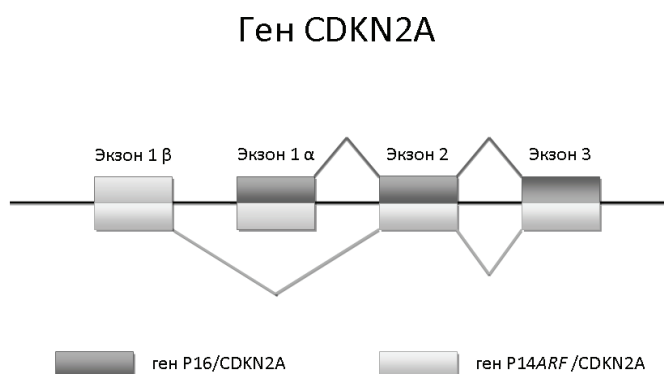
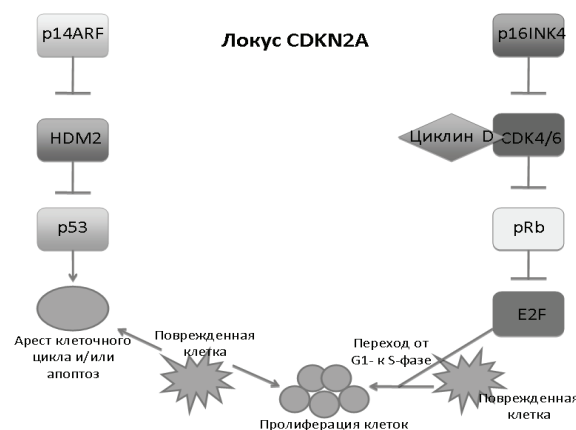
*Удаление 19 пар оснований во 2 экзоне, приводящее к образованию химерного белка, состоящего из 1N'-концевой области p16 и C-концевой области p14ARF;

**Замещение гуанина на тимидин 34 нуклеотидами выше стартового кодона p16, что приводит к образованию нового сайта инициации с созданием балка с другой рамкой считывания.

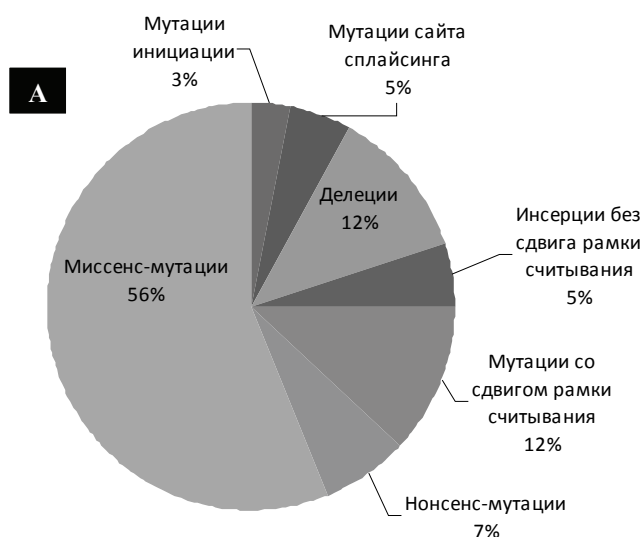
Таблица 5

Сходный спектр соматических и герминальных мутаций *CDKN2A/P16* [54]

Мутации <i>CDKN2A</i>	Соматические	Герминальные
C:G > G:C	7%	13%
C:G > A:T	14%	17%
C:G > T:A (CpG)	20%	10%
C:G > T:A (non CpG)	22%	12%
A:T > T:A	4%	2%
A:T > G:C	6%	10%
A:T > C:G	2%	9%
del/ins	17%	25%
тандемные	4%	1%
комплексные	1%	1%

Рис. 1. Локус и транскрипты *CDKN2A*.Рис. 2. Схема регуляции гена *CDKN2A*.

Типы герминальных мутаций *CDKN2A*



Спектр герминальных мутаций *CDKN2A (p16)*

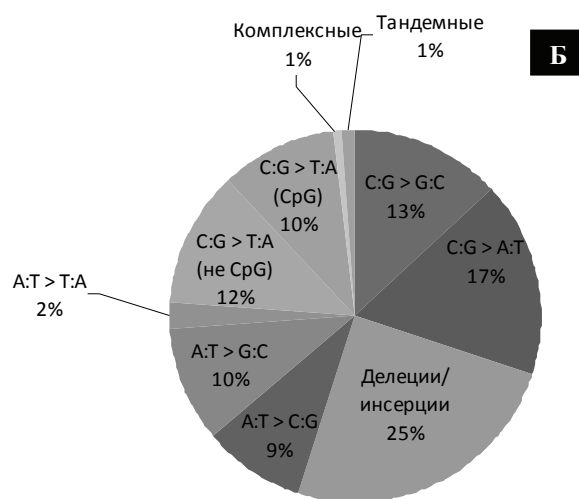
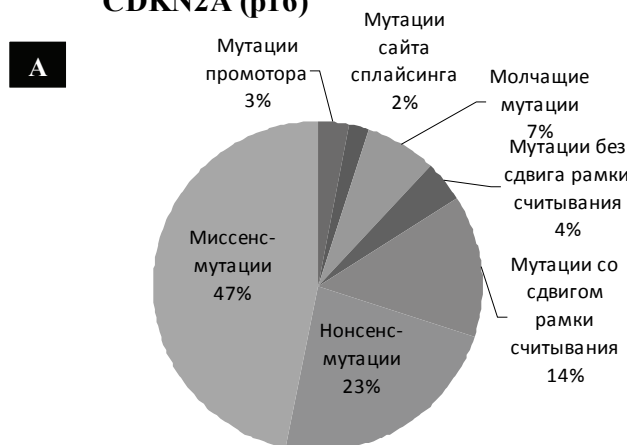


Рис. 3. График...

А: типы герминальных мутаций *CDKN2A/P16* [по данным 21; 54].Б: спектр герминальных мутаций *CDKN2A/P16* [по данным 21; 54].

Типы соматических мутаций *CDKN2A (p16)*



Спектр соматических мутаций *CDKN2A (p16)*

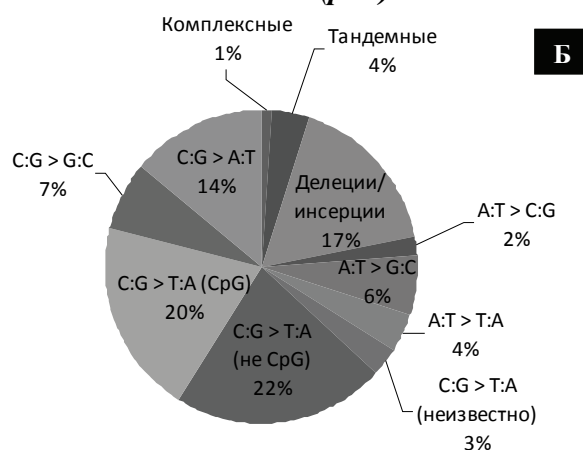


Рис. 4. График...

А: типы соматических мутаций *CDKN2A/P16* [по данным 54].Б: спектр соматических мутаций *CDKN2A/P16* [по данным 54].

Кроме того, имеются сведения, что герминальные мутации, затрагивающие 5'-конец *CDKN2A*, могут иметь клиническое значение и ассоциированы с предрасположенностью носителей к МК [30; 48].

N. Hayward суммировал данные основных исследований, касающиеся происхождения наиболее часто встречающихся мутаций в *CDKN2A*. Отмечены популяционные различия выявленных мутаций в зависимости от национальной принадлежности [32].

Стоит отметить, что мутации в *CDKN2A* обнаруживают также и при спорадической МК, однако их частота невелика – всего 1–2 % [70]. Большая часть соматических мутаций гена [23; 33] представлена миссенс- и нонсенс-вариантами, а также мутациями со сдвигом рамки считывания (рис. 4 а–б). Гомозиготные делеции этого гена обнаруживаются в 19 % случаев опухолей, в то время как точковые мутации составляют не более 3 % [56].

За время изучения этого гена были определены основные точковые мутации *CDKN2A/p16* при МК: Ile41Thr, Arg50Ter, Asn63Ser, Arg79Pro, Gly93Trp, Val118Asp, Ala140Th, а также мутация альтернативного сайта сплайсинга IVS2+1, считающиеся на сегодняшний день *hot point*¹ [66].

Суммируя работы, касающиеся частотного спектра мутаций, показано, что между соматическими и герминальными мутациями гена *CDKN2A/p16* существует гомология (табл. 5).

В то время, как мутации в *CDKN2A/p16* ответственны за 20–40 % случаев наследственной МК [28; 71], герминальные мутации *CDKN2A/p14ARF* (*ARF* – alternate reading frame – альтернативная рамка считывания) обнаруживают в среднем в 25 % наследственных форм МК [72].

CDKN2A/p14ARF кодирует регулятор клеточного цикла, предотвращающий деградацию p53, что ведет к увеличению его концентрации и далее – к активации этого белка. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК. Таким образом осуществляется регуляция запуска и прекращения клеточного роста (рис. 3).

Основными соматическими мутациями, повреждающими *p14ARF* являются делеции. Гомозиготные делеции этого гена обнаруживаются в 19 % случаев опухолей, в то время как точковые мутации составляют не более 3 %.

Так как *CDKN2A/p16* и *CDKN2A/p14ARF* кодируются одной последовательностью ДНК, оба гена очень часто инактивируются вследствие одного и того же повреждения.

В целом, мутации и метилирование гена *CDKN2A* часто наблюдаются не только в наследственных и спорадических меланом, но и в большой группе других ненаследственных новообразований: раке поджелудочной железы, пищевода, желчных путей, мочевого пузыря, Т- и В-клеточных острых лимфолейкозах, мезотелиомах, анапластических астроцитомах, глиобластомах и др. [3].

Исследование группы В.Е.Г. Rothberg было посвящено выявлению корреляции прогностических маркеров с общей выживаемостью больных МК [63]. Анализ основан на определении уровней экспрессии белков, вовлеченных в патогенез МК. Установлено, что повышение экспрессии p16/CDKN2A значительно улучшает прогноз при МК (возможно, это связано с ингибированием абберантной клеточной пролиферации меланоцитов, индуцируемой данным белком [59]). Более того, повышение экспрессии p16/CDKN2A об-

ладает протективным эффектом в отношении снижения смертности пациентов от МК [64]. Эти данные согласуются с ранее проведенным исследованием O. Straume et al., в котором снижение экспрессии p16/CDKN2A было ассоциировано с увеличением пролиферативной активности опухолевых клеток (Ki-67) и являлось независимым фактором прогноза снижения выживаемости больных МК [73]. Наряду с этим было продемонстрировано, что аллельные потери в области *p16/CDKN2A* и последующее снижение экспрессии белка ведут к прогрессированию МК [59]. В частности, гомозиготные делеции локуса *INK4* (*CDKN2*), кодирующего как p16(*INK4a*) так и p14(*ARF*), являются наиболее частыми генетическими перестройками при МК и коррелируют со снижением общей выживаемости при различных типах опухолей, включая МК [24]. На основании проведенной работы по оценке прогностической значимости генетических нарушений локуса *CDKN2* Casula M. et al. пришли к выводу, что тестирование *p16/CDKN2A* может применяться в качестве маркера, предсказывающего одновременно предрасположенность к развитию МК и прогноз данного заболевания [12].

Ген *CDK4/ CYCLIN-DEPENDENT KINASE 4* (12q13) (OMIM № 123829). Ген *CDK4* (циклин-зависимая киназа 4) расположен на длинном плече 12 хромосомы и является онкогеном. На сегодняшний день герминальные мутации этого гена (*Arg24Cys* и *Arg24His*) описаны лишь в нескольких семьях больных МК, встречаются редко и актуальны, по-видимому, лишь для небольшой подгруппы наследственной МК [8; 20; 32].

Ген *CMM1* (1p36) (OMIM № 155600). Ген *CMM1*, расположенный на коротком плече 1 хромосомы, был первым идентифицированным потенциальным геном, отвечающим за предрасположенность к МК [7], однако позже были получены данные, согласно которым его значение оказалось незначительным [8; 11; 26].

Низкопенетрантные гены

Ген *MC1R/MELANOCORTIN 1 RECEPTOR* (16q24) (OMIM № 155555). *MC1R* расположен на длинном плече 16 хромосомы. Варианты последовательности этого гена выявляются гораздо чаще среди больных МК, чем у здоровых лиц [32]. Наличие одной структурно-функциональной перестройки гена *MC1R* увеличивает риск развития МК в 2,2–3,9 раза; двух – в 4,1–4,8 раза [32; 78]. Наиболее частыми мутантными вариантами являются V60L, R151C, R163Q, D84E и R160W [8].

Вклад *MC1R* в риск развития МК связан, главным образом, с рыжим цветом волос. Так, при исследовании образцов меланом, полученных от больных в Великобритании и Ирландии, 53 % лиц с рыжими волосами несли один вариантный аллель *MC1R* и 29% – два вариантных аллеля [58; 78]. Причем только у рыжеволосых людей были обнаружены одновременно два варианта. Частота подобных изменений у блондинов, брюнетов и лиц с черными волосами не превышала 33 %. Кроме того, наличие вариантов последовательности *MC1R*, выступающего в роли модификатора риска, приводит к увеличению пенетрантности мутаций гена *CDKN2A* с 50 % до 84 % и снижению среднего возраста начала заболевания до 20 лет [10].

Ген *XP* (Пигментная ксеродерма, *XERODERMA PIGMENTOSUM*, *COMPLEMENTATION GROUP A*; *XPA*) (9q22.33) (OMIM № 278700) ассоциирован с редким аутосомно-рецессивным хронически прогрессирующим заболеванием кожи – пигментной ксеродер-

¹ горячими точками (англ.)

мой (ПК). У пациентов с этим заболеванием нарушена способность репарировать повреждения хромосомной ДНК, индуцированные УФ-радиацией, что приводит к повышенной фоточувствительности и последующему поражению кожных покровов. То же самое происходит при развитии атипичных новообразований кожи, в том числе при МК. К.Н. Kraemer et al. сообщили, что злокачественные образования кожи встречаются у 70 % больных пигментной ксеродермой [43]. МК наблюдается у 22 % пациентов с ПК, при этом риск ее развития в возрасте до 20 лет повышен в 1000 раз. Lynch H.T. et al. предположили, что больных ПК можно отнести к группе с высоким риском развития МК [51].

Ген *BRAF* (V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1) (7q34) (OMIM № 164757), кодирующий серин-треонинную протеинкиназу, был идентифицирован в 1992 году [16]. *BRAF* является протоонкогеном и посредством MAP-киназного пути участвует в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток.

Соматические мутации в *BRAF* наблюдаются в 40–88 % [36] случаев МК и в 74–82 % случаев меланоцитарных невусов. В подавляющем большинстве случаев речь идет о мутации V600E в 15 экзоне, приводящей к конститутивной активации гена *BRAF*. Тем не менее, были получены данные о том, что *BRAF* может быть отнесен к генам, ассоциированным с низким риском развития МК [8]. В работе K. Laud et al. была исследована вся кодирующая область *BRAF* на наличие герминальных мутаций у 80 пациентов с первично-множественной МК и семей, отягощенных МК, у которых отсутствовали герминальные мутации в основных генах, ответственных за наследственную предрасположенность к МК, *CDKN2A/p16INK4A/p14ARF* и *CDK4* [45]. Были идентифицированы 13 вариантов строения гена, 4 из которых – «молчащие» мутации в кодирующих регионах и 9 – нуклеотидные замены в интронах. Таким образом, установлено, что герминальные варианты *BRAF* являются полиморфизмами, а сам ген не влияет на риск развития МК. В последующем M. Casula et al. исследовали геномную ДНК 569 больных с МК из Италии на наличие герминальных и соматических мутаций в гене *BRAF* [13]. Три герминальных варианта – M116R, V599E и G608H – в 3 и 15 экзонах гена *BRAF* были обнаружены у 4 пациентов (0,7 %). Ученые пришли к выводу, что вклад этого гена в предрасположенность к развитию МК минимален, подчеркивая его доминирующее влияние на развитие спорадической МК.

И все же остается неясным, могут ли определенные полиморфные варианты гена *RAF* быть связаны с повышенным риском МК?

В то время, как в одних исследованиях был продемонстрирован значительный риск развития МК для носителей некоторых интронных вариантов или герминальных однонуклеотидных полиморфизмов в гене *BRAF* [37; 52], в других подобных исследованиях корреляций обнаружено не было [13; 36].

Также опубликованы данные о связи герминальных мутаций *BRAF* с наследственным кардиофацио-кожным синдромом, при котором у пациентов имеются множественные врожденные аномалии развития, умственная отсталость, низкорослость, задержка психомоторного развития, врожденные пороки сердца, аномалии кожи, глаз, ЖКТ и ЦНС, что подтверждает многофункциональность данного гена [62; 76].

В литературе также имеются данные о влиянии мутаций *BRCA2*, прежде всего, ответственного за наследственные формы рака молочной железы и яичников [71], и полиморфизмов генов рецептора эпидермального фактора роста [32; 68], изоферментов глутатион-S-трансферазы [32; 38] и рецептора витамина D (*VDR*) [35] на увеличение риска развития МК [17]. Однако эти данные противоречивы и требуют дальнейшего изучения.

Заключение

Достижения в области молекулярной генетики вносят вклад в изучение этиологии, механизмов наследования, рисков развития и ассоциации генетический перестроек с клиническим течением наследственной МК. Ген *CDKN2A* ответственный за 20–50 % случаев наследственной МК, вклад других изученных генов не превышает нескольких процентов, и они, скорее всего, играют модифицирующую роль в патогенетическом комплексе.

Остальные ключевые гены, отвечающие за развитие семейной МК, еще только предстоит идентифицировать.

Таким образом, обзор представленных данных обосновывает необходимость дальнейшего изучения наследственной формы МК для своевременной диагностики и последующего динамического наблюдения пациентов группы риска в условиях онкодиспансера.

Литература

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2008 г. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина. – 2010. – Т. 21, № 2. – С. 13–58.
2. Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю. Адьювантное лечение больных меланомой кожи // Практическая онкология. Отечественная школа онкологов. – 2001. – № 4(8). – С. 42–49.
3. Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. В кн: Канцерогенез. / Под ред. Д.Г. Заридзе. – М.: Медицина, 2004. – С. 125–56.
4. American Cancer Society (2008). Cancer Facts and Figures 2008. Atlanta, GA: American Cancer Society. Retrieved August 10, 2008 – URL: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/2008caffinalsecuredpdf.pdf>.
5. Aspinwall L., Leaf S., Dola E. et al. CDKN2A/p16 genetic test reporting improves early detection intentions and practices in high-risk melanoma families // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008;17 – P. 1510–1519.
6. Balch C.M., Soong S.J., Shaw H.M. et al. An analysis of prognostic factors in 8,500 patients with cutaneous melanoma. – Cutaneous Melanoma. – 2nd ed. – Philadelphia: J.B. Lippincott, 1992. – P. 165.
7. Bale S.J., Dracopoli N.C., Tucker M.A. et al. Mapping the for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p // N Engl J Med. – 1989. – 320(21). – P. 1367–72.
8. Berking C., Bosserhoff A.K. Malignant Melanoma. – Hereditary tumors / Allgayer H., Rehder H., Fulda S. – WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, 2009 – P. 411–20.
9. Bishop D.T., Demenais F., Goldstein A.M. et al. Melanoma Genetics Consortium. Geographical variation in

- the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma // J Natl Cancer Inst. – 2002. – 94(12). – P. 894–903.
10. Box N.F., Duffy D.L., Chen W. et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations // Am J Hum Genet. – 2001. – 69(4). – P. 765–73.
 11. Cannon-Albright L.A., Goldgar D.E., Wright E.C. et al. Evidence against the reported linkage of the cutaneous melanoma-dysplastic nevus syndrome locus to chromosome 1p36 // Am J Hum Genet. – 1990. – 46(5). – P. 912–8.
 12. Casula M., Budroni M., Cossu A. et al. The susceptibility CDKN2 locus may have a role on prognosis of melanoma patients // Ann Oncol. – 2010. – 21(6). – P. 1379–80.
 13. Casula M., Colombino M., Satta M.P. et al. Italian Melanoma Intergroup Study. BRAF gene is somatically mutated but does not make a major contribution to malignant melanoma susceptibility: the Italian Melanoma Intergroup Study // J Clin Oncol. – 2004. – 22(2). – P. 286–92.
 14. Chin L., Merlino G., DePinho R.A. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box // Genes Dev. – 1998. – 12(22). – P. 3467–81.
 15. Dyson N., Baiman A. Oncogenes and cell proliferation // Current opinion in genetics and development. – 1999. – 9. – P. 11–4.
 16. Eychene A., Barnier J.V., Apiou F. et al. Chromosomal assignment of two human B-raf(Rml) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94Braf/Rml and B-raf-2, a processed pseudogene // Oncogene. – 1992. – 7. – P. 1657–60.
 17. Fargnoli M.C., Argenziano G., Zalaudek I. et al. High- and low-penetrance cutaneous melanoma susceptibility genes // Expert Rev Anticancer Ther. – 2006. – 6(5). – P. 657–70.
 18. Genetics Home Reference <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDKN2A>.
 19. Goldstein A.M., Chan M., Harland M. et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents // J Med Genet. – 2007. – 44. – P. 99–106.
 20. Goldstein A.M., Chidambaram A., Halpern A. et al. Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma // Melanoma research. – 2002. – 12. – P. 51–5.
 21. Goldstein A.M. Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations // Hum Mutat. – 2004. – 23(6). – P. 630.
 22. Goldstein A.M., Tucker M.A. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: A global perspective // Archives of Dermatology. – 137(11). – P. 1493–6.
 23. Gonzalez-Zulueta M., Bender C.M., Yang A.S. et al. Methylation of the 5.CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing // Cancer research. – 1995. – 55. – P. 4531.
 24. Grafstrom E., Egyhazi S., Ringborg U. et al. Biallelic deletions in INK4 in cutaneous melanoma are common and associated with decreased survival // Clin Cancer Res. – 2005. – 11. – P. 2991–7.
 25. Grange F., Chompret A., Guillaud-Bataille M. et al. Comparison between familial and non-familial melanoma in France // Arch Dermatol. – 1995. – 131. – P. 1154–9.
 26. van Haeringen A., Bergman W., Nelen M.R. et al. Exclusion of the dysplastic nevus syndrome (DNS) locus from the short arm of chromosome 1 by linkage studies in Dutch families // Genomics. – 1989. – 5(1). – P. 61–4.
 27. Haluska F.G., Tsao H., Wu H. et al. Genetic Alterations in Signaling Pathways in Melanoma // Clin Cancer Res. – 2006. – 12(7 Pt 2). – P. 2301–7.
 28. Hansen C.B., Wadga L.M., Lowstuter K. et al. Clinical germline genetic testing for melanoma // Lancet Oncol. – 2004. – 5. – P. 314–9.
 29. Hansson J. Familial cutaneous melanoma // Adv Exp Med Biol. – 2010. – 685. – P. 134–45.
 30. Harland M., Holland E.A., Ghiorzo P. et al. Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families // Genes Chromosomes Cancer. – 2000. – 28. – P. 45–57.
 31. Hashemi J., Platz A., Ueno T. et al. CDKN2A germ-line mutations in individuals with multiple cutaneous melanomas // Cancer Res. – 2000. – 60(24). – P. 6864–7.
 32. Hayward N.K. Genetics of melanoma predisposition // Oncogene. – 2003. – 22(20). – P. 3053–62.
 33. Herman J.G., Merlo A., Mao L. et al. Inactivation of the CDKN2A/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers // Cancer research. – 1995. – 55. – P. 4525.
 34. High W., Robinson W. Genetic mutations involved in melanoma: a summary of our current understanding // Adv Dermatol. – 2007. – 23. – P. 61–79.
 35. Hutchinson P.E., Osborne J.E., Lear J.T. et al. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma // Clin Cancer Res. – 2000. – 6(2). – P. 498–504.
 36. James M.R., Dumeni T., Stark M.S. et al. Rapid screening of 4000 individuals for germ-line variations in the BRAF gene // Clin Chem. – 2006. – 52(9). – P. 1675–8.
 37. James M.R., Roth R.B., Shi M.M. et al. BRAF polymorphisms and risk of melanocytic neoplasia // J Invest Dermatol. – 2005. – 125. – P. 1252–8.
 38. Kanetsky P.A., Holmes R., Walker A. et al. Interaction of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and malignant melanoma // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2001. – 10(5). – P. 509–13.
 39. Kefford R., Mann G. Is there a role for genetic testing in patients with melanoma // Curr Opin Oncol. – 2003. – 15. – P. 157–61.
 40. Kefford R.F., Newton Bishop J.A., Bergman W. et al. Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: a consensus statement of the Melanoma Genetics Consortium // J Clin Oncol. – 1999. – 17. – P. 3245–51.
 41. Koh J., Enders G.H., Cynlacht B.D. et al. Tumor-derived p16 alleles encoding protein defective in cell-cycle inhibition // Nature. – 1995. – 375. – P. 506.
 42. Kopf A.W., Hellman L.J., Rogers G.S. et al. Familial malignant melanoma // JAMA. – 1986. – 256. – P. 1915–9.
 43. Kraemer K.H., Lee M.M., Andrews A.D. et al. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm // Arch Dermatol. – 1994. – 130(8). – P. 1018–21.

44. *Laennec R.T.H.* Sur les melanoses // Bulletin de Faculte de Medecine Paris. – 1806. – P. 1–24.
45. *Laud K., Kannengiesser C., Avril M.F. et al.* French Hereditary Melanoma Study Group. BRAF as a melanoma susceptibility candidate gene? // Cancer Res. – 2003. – 63(12). – P. 3061–5.
46. *Leachman S.A., Carucci J., Kohlmann W. et al.* Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma // J Am Acad Dermatol. – 2009. – 61(4). – 677. – e1–14.
47. *Lin J., Hocker T.L., Singh M. et al.* Genetics of melanoma predisposition // The British Journal of Dermatology. – 2008. – 159(2). – P. 286–91.
48. *Liu L., Dihworth D., Gao L. et al.* Mutation of the CDKN2A 59 UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma // Nat. Genet. 1999. – 21. – P. 128–32.
49. *Lukas J., Parry D., Aagaard L. et al.* Retino-blastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumor suppressor p16 // Nature. – 1995. – 375. – P. 503.
50. *Lynch H.T., Brand R.E., Hogg D. et al.* Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome // Cancer. – 2002. – 94(1). – P. 84–96.
51. *Lynch H.T., Fusaro R.M., Johnson J.A.* Xeroderma pigmentosum. Complementation group C and malignant melanoma // Arch Dermatol. – 1984. – 120(2). – P. 175–9.
52. *Meyer P., Sergi C., Garbe C.* Polymorphisms of the BRAF gene predispose males to malignant melanoma // J Carcinogen. – 2003. – 2. – P. 7.
53. *Monzon J., Liu L., Brill H. et al.* CDKN2A mutations in multiple primary melanomas // N Engl J Med. – 1998. – 338. – P. 879–87.
54. *Murphy J.A., Barrantes-Reynolds R., Kocherlakota R. et al.* The CDKN2A Database: Integrating Allelic Variants With Evolution, Structure, Function, and Disease Association // Hum Mutat. – 2004. – 24(4). – P. 296–304.
55. [No authors listed]. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium // J Natl Cancer Inst. – 1999. – 91 – P. 1310–6.
56. *Norman E Sharpless, Lynda Chin.* The INK4a/ARF locus and melanoma // Oncogene. – 2003. – 22. – P. 3092–8.
57. *Norris W.* A case of fungoid disease // Edinb. Med. Surg. J. – 1820. – 16 – P. 562–5.
58. *Palmer J.S., Duffy D.L., Box N.F. et al.* Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? // Am J Hum Genet. – 2000. – 66(1). – P. 176–86.
59. *Palmieri G., Casula M., Sini M.C. et al.* Issues affecting molecular staging in the management of patients with melanoma // J Cell Mol Med. – 2007. – 11. – P. 1052–68.
60. *Puig S., Malvehy J., Badenas C. et al.* Role of the CDKN2A Locus in patients with multiple primary melanomas // J Clin Oncol. – 2005. – 23 – P. 3043–51.
61. *Rieder H., Bartsch D.K.* Familial pancreatic cancer // Fam Cancer. – 2004. – 3. – P. 69–74.
62. *Rodriguez-Viciana P., Tetsu O., Tidyman W. et al.* Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause Cardio-facio-cutaneous syndrome // Science. – 2006. – 311. – P. 1287–90.
63. *Rothberg B.E.G., Berger A.J., Molinaro A.M. et al.* Melanoma prognostic model using tissue microarrays and genetic algorithms // J Clin Oncol. – 2009. – 27. – P. 5772–80.
64. *Rothberg B.E.G., Bracken M.B., Rimm D.L.* Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis // J Natl Cancer Inst. – 2009. – 101. – P. 452–74.
65. *Russo A.A., Tong L., Lee J.O. et al.* Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. // Nature. – 1998. – 395(6699). – P. 237–43.
66. *Rutter J.L., Goldstein A.M., Davila M.R. et al.* CDKN2A point mutations D153spl (c.457G>T) and IVS2+1G>T result in aberrant splice products affecting both p16INK4a and p14ARF // Oncogene. – 2003. – 22(28). – P. 4444–8.
67. *Serrano M., Lee H., Chin L. et al.* Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality // Cell. – 1996. – 85. – P. 27.
68. *Shahbazi M., Pravica V., Nasreen N.* Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma // Lancet. – 2002. – 359(9304). – P. 397–401.
69. *Snoo de F.A., Gruis N.A.* Familial melanoma // Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. – April 2005. – URL: <http://atlasgeneticsoncology.org/Kprones/FamilialMelanomaID10088.html>.
70. *Somoano B., Niendorf K.B., Tsao H.* Hereditary cancer syndromes of the skin // Clin Dermatol. – 2005. – 23 – P. 85–106.
71. *Soufir N., Basset-Seguin N.* The INK4a-ARF locus: role in the genetic predisposition to familial melanoma and in skin carcinogenesis // Bull Cancer. – 2001. – 88(11). – P. 1061–7.
72. *Soufir N., Lacapere J.J., Bertrand G. et al.* Germline mutations of the INK4a-ARF gene in patients with suspected genetic predisposition to melanoma // British Journal of Cancer. – 2004. – 90. – P. 503–9.
73. *Straume O., Sviland L., Akslen L.A.* Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma // Clin Cancer Res. – 2000. – 6(5). – P. 1845–53.
74. *Thompson J.F., Scolyer R.A., Kefford R.F.* Cutaneous melanoma // Lancet. – 2005. – 365(9460). – P. 687–701.
75. *Tucker M.A., Goldstein A.M.* Melanoma etiology: where are we? // Oncogene. – 2003. – 22. – P. 3042–52.
76. *Urošević J., Sauzeau V., Soto-Montenegro M.L. et al.* Constitutive activation of B-Raf in the mouse germ line provides a model for human cardio-facio-cutaneous syndrome // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. – 108(12). – P. 5015–20.
77. *Urteaga O., Pack G.T.* On the antiquity of melanoma // Cancer. – 1966. – 19(5). – P. 607–10.
78. *Valverde P., Healy E., Jackson I. et al.* Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans // Nat Genet. – 1995. – 11(3). – P. 328–30.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АОС – антиоксидантная система	НК – натуральные киллеры
АОК – антителообразующие клетки	НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
АЛК – 5-аминолевулиновая кислота (δ -aminolevulinic acid)	НО – нанооболочки
АФК – активные формы кислорода	НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества
АЛС – антилимфоцитарная сыворотка	НПТ – наилучшая поддерживающая терапия
АТГ – антиtimoцитарный глобулин	НСф – наносферы
АТК – аденокарцинома толстой кишки	НСт – наностержни
БПВП – базисные противовоспалительные препараты	НСПВС – нестероидные противовоспалительные средства
БКС – бинарная каталитическая система	НХЛ – неходжкинская лимфома
ВБН – вирус болезни Ньюкасла	НЭ – нуклеиновый эквивалент
ВКМ – внеклеточный матрикс	ОБО – объективный ответ
ВРПС – водорастворимые полисахариды	ОДС – оптическая диффузионная спектроскопия
ВМ – васкулогенная мимикрия	ОО – отсутствие ответа
ВЧД – внутричерепное давление	ОКТ – оптическая когерентная томография
ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр	ОЦ – окисленный целлюлоз
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография	ОЦК – объем циркулирующей крови
ВЭФР-А – васкулоэндотелиальный фактор роста-А	ОП – опухолевой плеврит
в/б – внутрибрюшинно	ОМ – опухолеассоциированные маркеры
в/в – внутривенно	ОЭ – объективный эффект
ГДА – гистоновая деацетилаза	ПАВ – поверхностно активные вещества
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа	ПВП – поливинилпирролидон
ГИСО – гастроинтестинальные стромальные опухоли	ПД – пролиферация и дифференцировка
ГИБП – генно-инженерные биологические препараты	ПЖЖ – поджелудочная железа
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома	ПЗ – прогрессирование заболевания
бГК – быстрорастущая дедифференцированная	ПМЗО – первично-множественные злокачественные ново-
гепатоцеллюлярная карцинома	образования
мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная	ПО – полный ответ
карцинома	ПОПР – полиоксипропилен
ГПВ/GPV – гликопептидная противоопухолевая вакцина	ПС – плевросклерозирующие средства
(glycopeptide cancer vaccine)	ПСА – простатический специфический антиген
ГЯФ – гепатоцитарных ядерных факторов	ПСАсв – простатический специфический антиген,
ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия	свободная форма
предстательной железы	ПСАобщ – простатический специфический
Докс – Доксорубин	антиген, общая форма
ИК Докс – иммунолипосомальных конструкций с	%ПСАсв – соотношение свободной формы ПСА
доксорубином	к общей, выраженное в процентах
ДРС – динамическое рассеяние света	ПТПГ – паратиреоидподобный гормон
ДМБА – диметил- α -бензантрацена	ПФОС – перфторорганические соединения
ДМТ – ДНК-метилтрансфераз	ППК – первичные половые клетки
ДЛФО – теория Дерягина – Ландау – Фервея – Овербека	ПК – периферическая кровь
ДК – диеновые конъюгаты	ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
ДЭС – двойной электрический слой	ПКГШ – плоскоклеточная карцинома головы и шеи
ЖТ – жировая ткань	ПХТ – полихимиотерапия
ЗНО – злокачественные новообразования	ПЭГ – полиэтиленгликоль
ЗО – злокачественное образование	ПЯ – палочкоядерный
ЗХВК – золотохлористоводородная кислота	РМЖ – рак молочной железы
ИДМ – иммунодефицитные мыши	МР РМЖ – местнораспространенный РМЖ
ИС – иммунная система	ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма РМЖ
ИК – иммунолипосомальные конструкции	РЭС – ретикулоэндотелиальная система
ИФН- γ – интерферон гамма	СИТ – специфическая иммунотерапия
ЛТ – лучевая терапия	ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота
ЛЛЛФ – лиофилизированной липосомальной ЛФ	ТИК – тканеинженерная конструкция
МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы	ТФ – транскрипционных факторов
МДС – миелодиспластический синдром	КРР – колоректальный рак
МВДП – медиана времени до прогрессирования	КРО – контроль роста опухоли
МИБТ – медицинские иммунобиологические препараты	КЗ – коллоидное золото
МЛ – моноклеарные лейкоциты	ИДР – инфильтративный дольковый рак (МЖ)
ММ – метамиелоцит(ы)	ИРО – индекс роста опухоли
ММР – матриксные металлопротеиназы	ИРИ – иммунорегуляторный индекс
МКА – моноклональные антитела	ИФА – иммуноферментный анализ
ММ – множественная миелома	ИЭ – индекс эффективности
МОВ – медиана общей выживаемости	КОИР – коэффициент ориентировочно-исследовательской
МРЛ – мелкоклеточный рак легкого	реакции
ММП – матриксные металлопротеиназы	КЭР – кардиозофагеальный рак
МРТ – магнитно-резонансная томография	ОАА – опухолеассоциированный антиген
МЧРА – метилчувствительный рестриктивный анализ	РА – ревматоидный артрит
НАД – никотинамидадениндинуклеотид	РСО – раствор стандартного образца

РКТ – рентгеновская компьютерная томография
 РЛ – рак легкого
 РМП – рак мочевого пузыря
 РМЖ – рак молочной железы
 РПК – рак прямой кишки
 РПЖ – рак поджелудочной железы
 РСО – рабочий стандартный образец
 РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов
 РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками
 РФ – ревматоидный фактор
 РФр – растворимые углеводные фракции
 НФр – нерастворимые углеводные фракции
 РЧА – эффективность радиочастотной абляции
 РШМ – рак шейки матки
 СВФ – стромально-васкулярная фракция
 СК – селекартен
 СЗП – свежемороженая плазма
 СО – суперинвазивный описторхоз
 СПС – сосудисто-подобные структуры
 СПЖ – средняя продолжительность жизни
 СЯ – сегментоядерный
 ТИМП – тканевые ингибиторы
 ТСХ – тонкослойная хроматография
 ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
 ТЭОС – тетраэтилортосиликата
 ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка
 УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография
 ФГА – фитогемагглютинин
 ФД – флуоресцентная диагностика
 ФИЦХ – флуоресцентной иммуноцитохимии
 ФР – факторы роста
 ФС – фотосенс
 ФСБ – фосфатно-солевой буфер
 ФСП – фармакопейная статья предприятия
 ФТ – фарнезил-трансфераза
 ФТС – фетальная телячья сыворотка
 ХГ – хорионический гонадотропин
 ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз
 ХТ – химиотерапия
 ЛСП – лимфосаркома Плисса
 ЦП – церулоплазмин
 ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид
 ЦФ – циклофосфан
 ЧО – частичный ответ
 ШМ – шейка матки
 ШО – шиффовые основания
 ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
 ЭФР – эпидермальный фактор роста
 ЭК – эндотелиальные клетки
 ЭМ – электронная микроскопия
 ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

%fPSA – fPSA/tPSA
 Akt – протеинкиназа B
 ADMET – drug administration, distribution, metabolism, excretion, and toxicological studies
 ASCUS – atypical squamous cells of undetermined significance
 AUC – Area Under the Curve
 BDFI – bioactivity-directed fractionation and isolation
 c-Kit – рецептор фактора стволовых клеток
 CFSE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
 CIN – cervical intraepithelial neoplasia
 (цервикальные интраэпителиальные неоплазии)
 COX – циклооксигеназа
 CRC – colorectal cancer
 EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

EPCAM – adhesion molecule of epithelial cells
 EPR effect – enhanced permeability and retention effect
 (эффект повышения проницаемости и удерживания)
 EMT – Epithelio-mesenchymal 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
 IC₅₀ – 50% -ной ингибирующей концентрации ().
 LDCI – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingaron
 LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюиса)
 LSIL – low-grade intraepithelial lesions
 MNNG – N-methyl-N¹-nitro-N-nitrosoguanidine
 mTOR – мишень рапамицина в клетках млекопитающих
 Mw – molecular weight (молекулярный вес)
 N-DMNA – N-dimethylnitrosoamine
 NE – nucleic acid equivalents epitope
 NSE – нейроспецифический энзим
 NTA – nitril triacetate acid (нитрилтрехуксусная кислота)
 IGFBP – insulin-like growth factor binding protein
 HER – human epidermal growth factor receptor
 HIF-1α – индуцируемый гипоксией фактор 1α
 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 histocompatibility complex
 PARP – поли(АДФ-рибоза) полимеразы
 PCa – prostate cancer
 PDGF – тромбоцитарный фактор роста
 PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста
 PDT – photodynamic therapy
 Pr – проспидин
 PSA – prostate-specific antigen
 tPSA – prostate-specific antigen, total form
 fPSA – prostate-specific antigen, free form
 Ph – филадельфийская хромосома
 Ph⁺ – наличие филадельфийской хромосомы
 PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (фосфатидилинозитол 3-киназа)
 RA – rheumatoid arthritis
 RF – rheumatoid factor
 ROC – анализ – Receiver Operating Characteristics curve analysis
 SAL – sterility assurance level
 SCCA – антиген плоскоклеточной карциномы
 SSCP-анализ (single-strand conformation polymorphism analysis, анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма)
 TGF – Transforming Growth Factors
 (трансформирующие факторы роста)
 VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor
 VM – vasculogenic mimicry

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИТЕЛ
У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ**

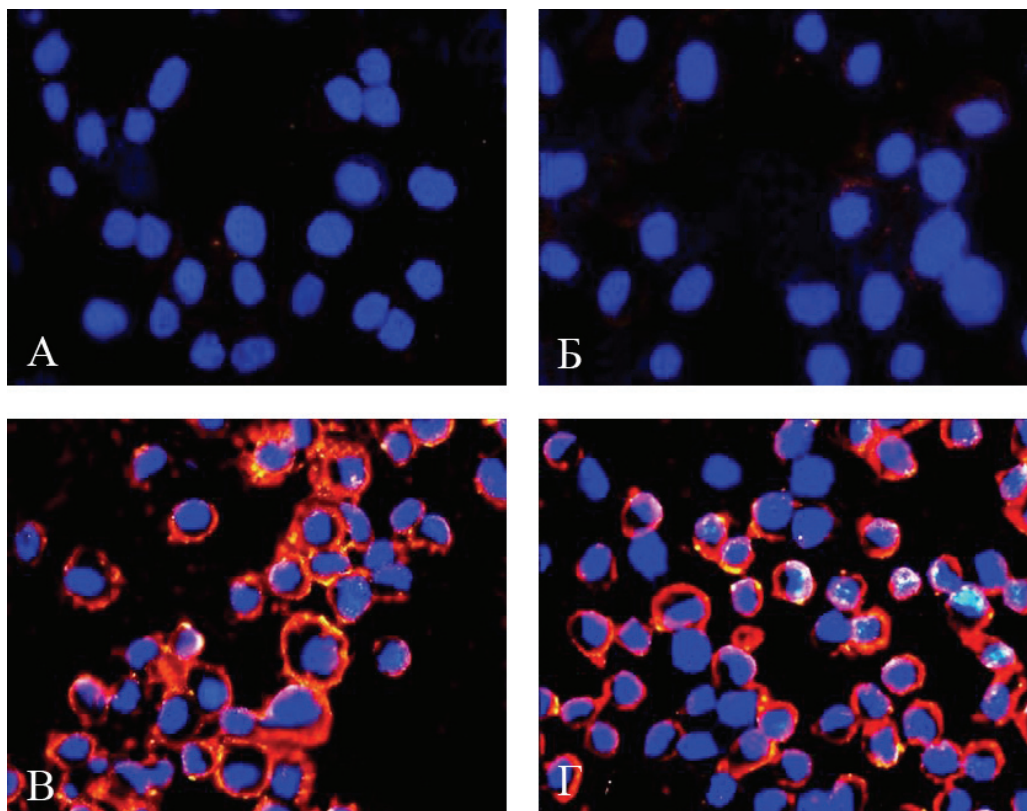


Рис. 1. Флуоресцентное иммуноцитохимическое выявление специфических IgM в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии: *mel Kor*. Окрашивание PE, Hoechst, увеличение $\times 400$

А: отрицательная реакция в контроле (сыворотка крови здорового донора),

Б: отрицательная реакция в сыворотке крови больного меланомой, получавшего дендритную вакцину;

В, Г: положительная реакция (специфическое окрашивание) в сыворотке крови больных, получавших вакцину Мелавак

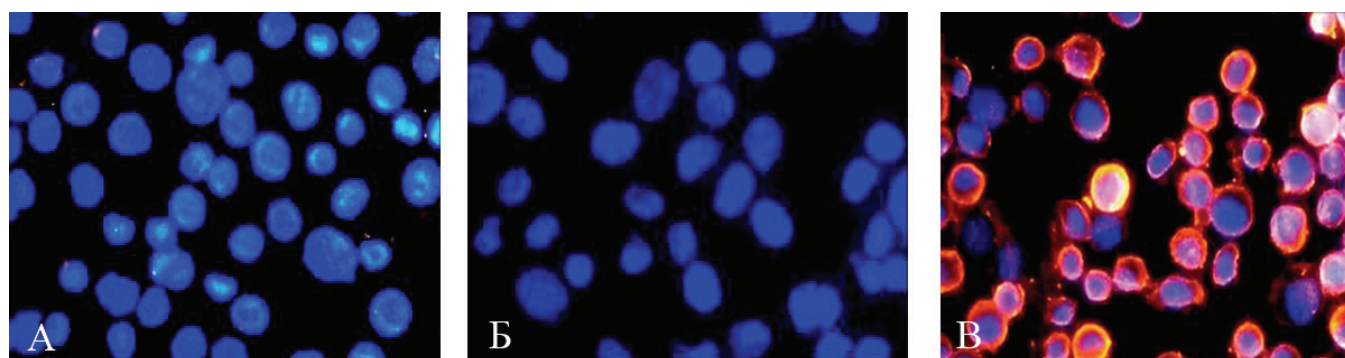


Рис. 2. Флуоресцентное иммуноцитохимическое выявление специфических IgM в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии: *mel Ibr*. Окрашивание PE, Hoechst, увеличение $\times 400$

А: отрицательная реакция в контроле (сыворотка крови здорового донора),

Б: отрицательная реакция в сыворотке крови больного меланомой, получавшего дендритную вакцину;

В: положительная реакция (специфическое окрашивание) в сыворотке крови больных, получавших вакцину Мелавак

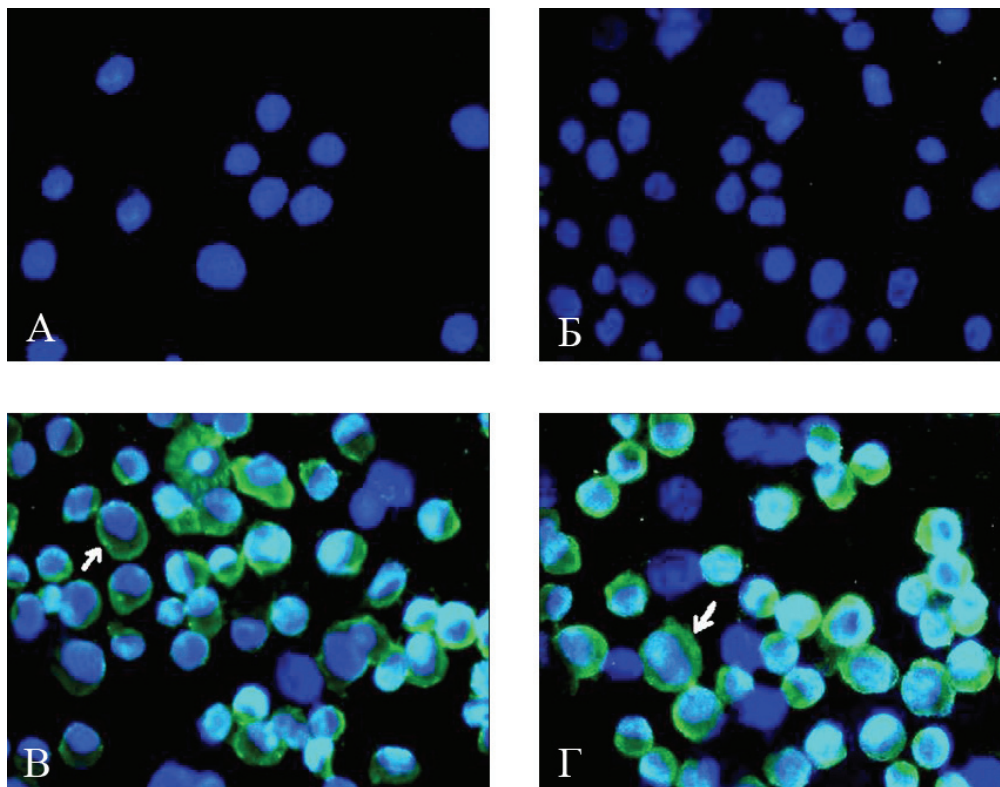


Рис. 3. Флуоресцентное иммуноцитохимическое выявление специфических IgG в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии: *mel Kor*. Окрашивание FITC , Hoechst, увеличение $\times 400$.

А: отрицательная реакция в контроле (сыворотка крови здорового донора),

Б: отрицательная реакция в сыворотке крови больного меланомой, получавшего дендритную вакцину;

В, Г: положительная реакция (специфическое окрашивание) в сыворотке крови больных, получавших вакцину Мелавак

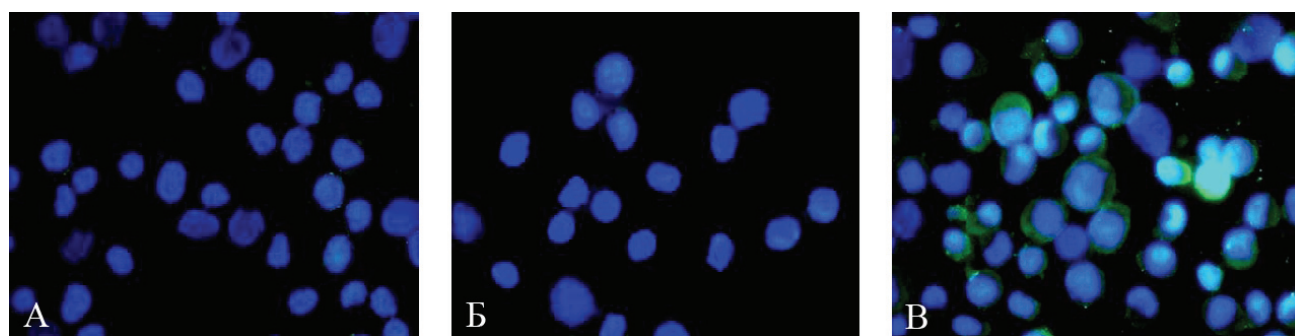


Рис. 4. Флуоресцентное иммуноцитохимическое выявление специфических IgG в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии: *mel Ibr*. Окрашивание FITC , Hoechst, увеличение $\times 400$.

А: отрицательная реакция в контроле (сыворотка крови здорового донора),

Б: отрицательная реакция в сыворотке крови больного меланомой, получавшего дендритную вакцину;

В: положительная реакция (специфическое окрашивание) в сыворотке крови больного, получавшего вакцину Мелавак)

**МЕТОДИКА ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРЕПАРАТОВ Г-КСФ, ИНТЕРФЕРОНОВ α , β
И СОМАТОТРОПИНА *IN VITRO***

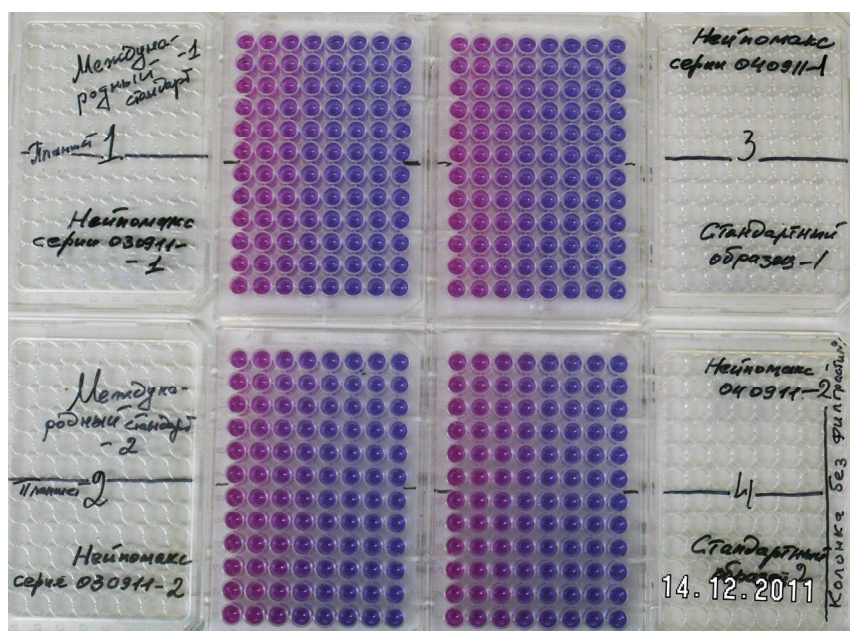


Рис. 1. Фотография четырех планшетов, на которых сравнивали специфическую активность двух серий (обозначенных как 1 и 2) рГ-КСФ «Нейпомакса» с Международным стандартом и Стандартным образцом (Россия) филграстима. Показателем активности служила степень конверсии красителя АмарБлю, меняющего при этом цвет с синего на розовый, клетками NFS-60, рост которых стимулируется филграстимом. Каждый «образец» был «поставлен» в двух повторностях, обозначенных как 1 и 2, например, Нейпомакс 1-1.

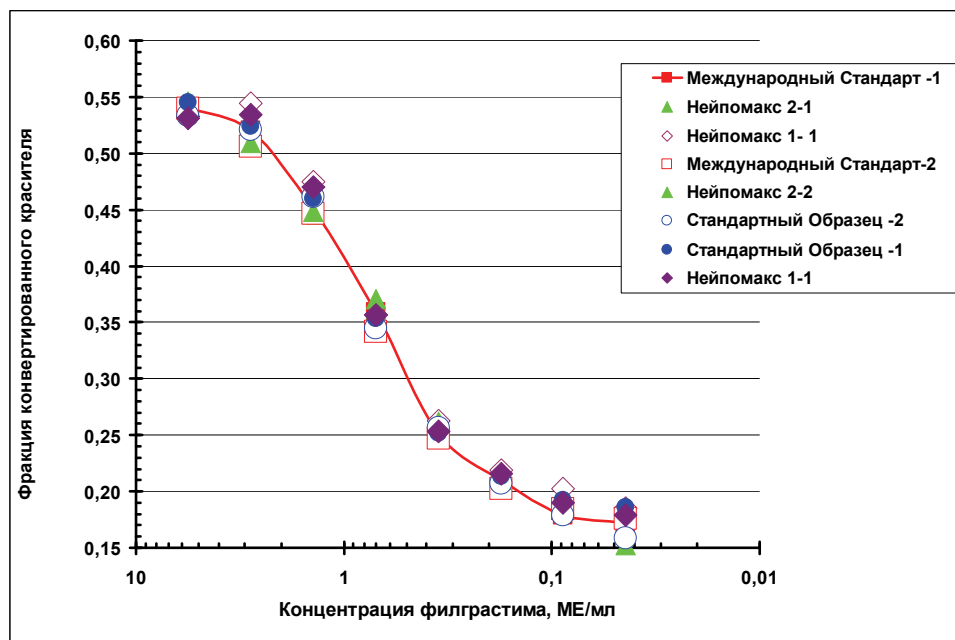


Рис. 2. Зависимость степени конверсии красителя АмарБлю от концентрации филграстимов в среде с растущими клетками NFS-60, определенная по экстинкции среды при 535 и 590 нм в лунках планшетов, фото которых представлено на рис. 1.

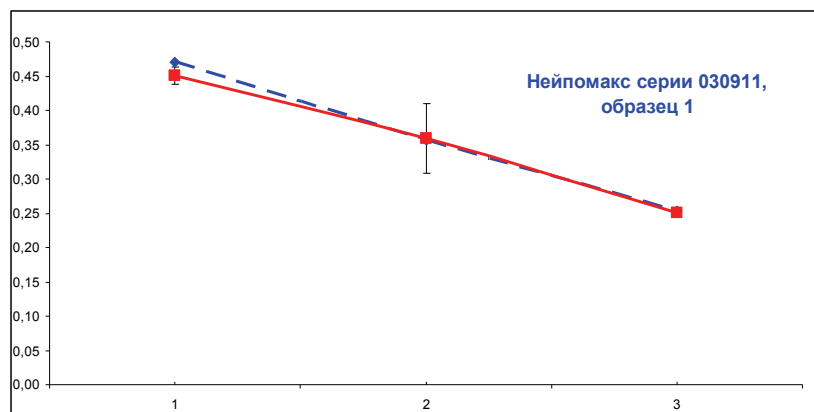


Рис. 3. Схема статистической обработки данных о специфической активности Нейпомакса серии 030911 относительно Международного стандарта филграстима ВОЗ, полученных в эксперименте, результаты которого приведены на рис. 2. Статистическая программа разработана А.В. Деминым (Мастерклон, Москва).

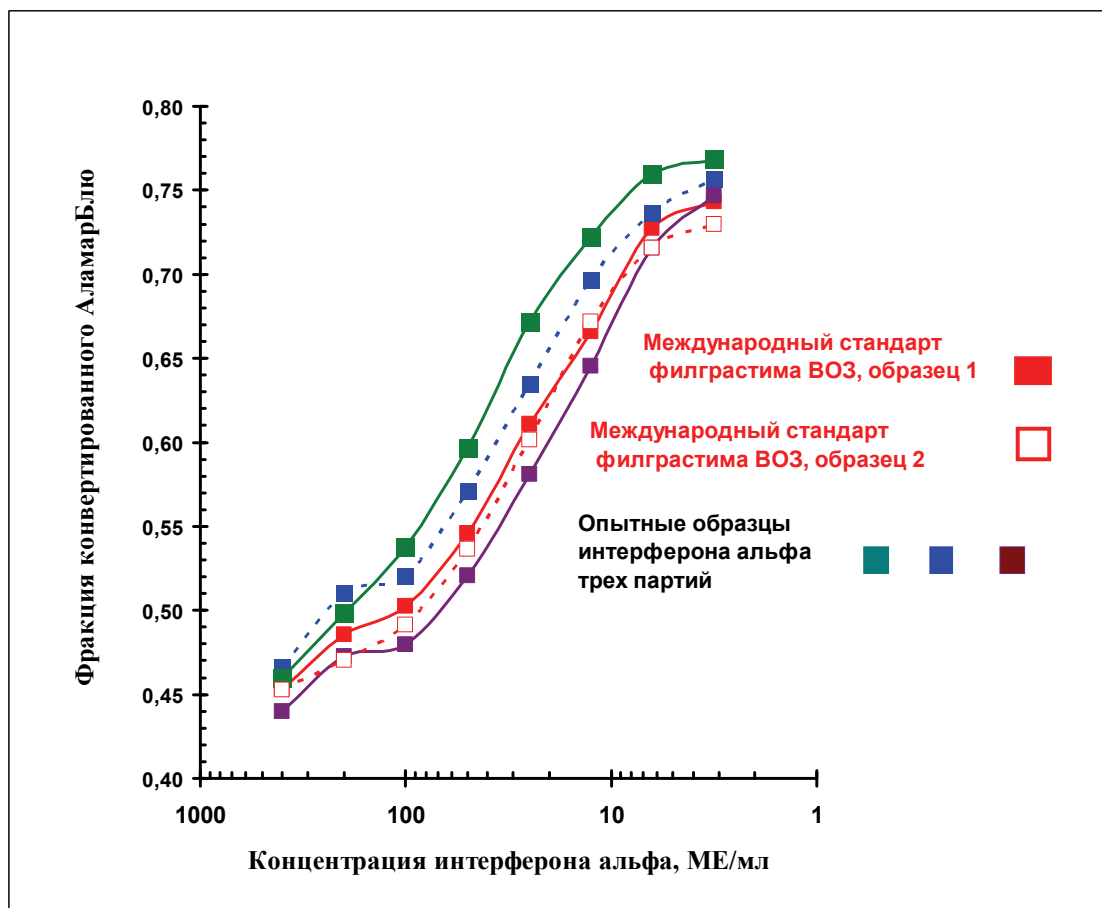


Рис. 4. Зависимость изменения окраски АламарБлю от концентрации Международного стандарта (№ 9-1 и 9-2) и изучаемых образцов (№ 1-8) интерферона α в среде. Сводные данные двух экспериментов.

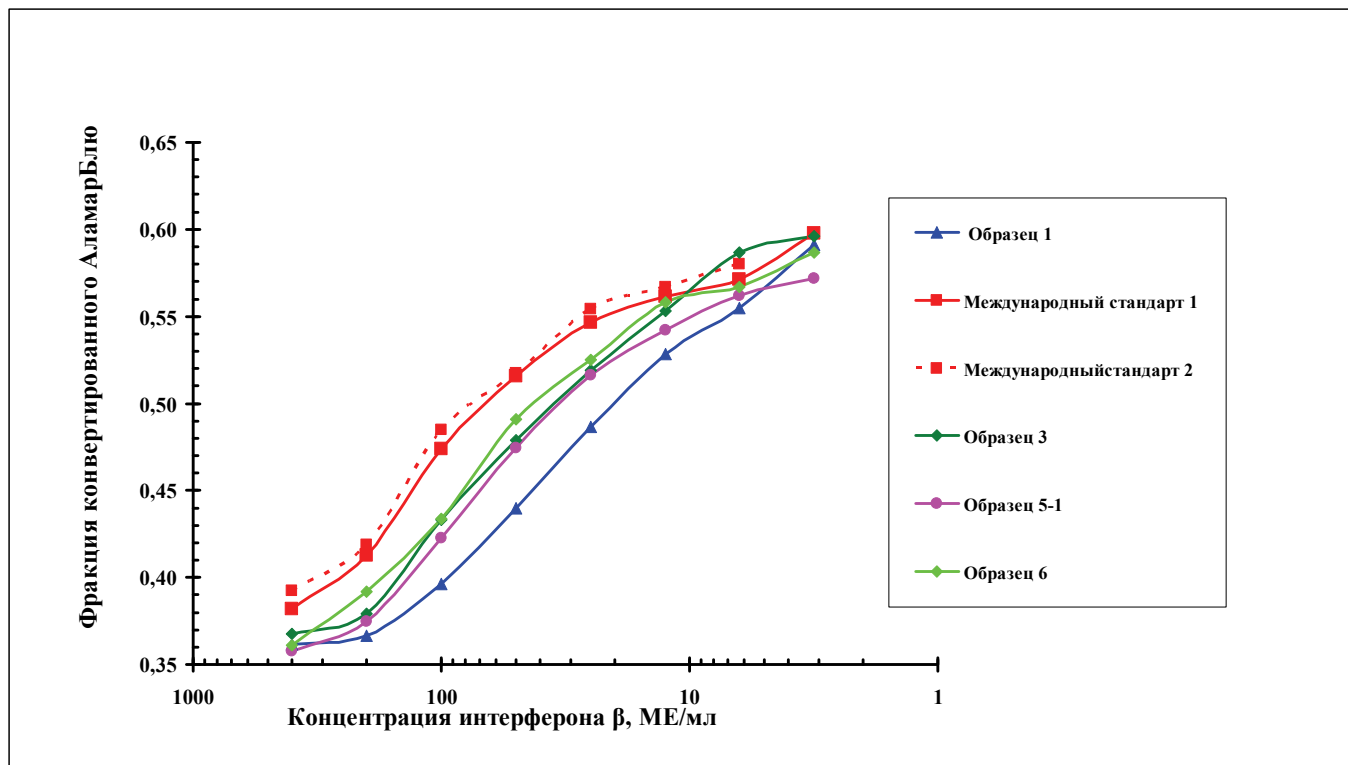


Рис. 5. Зависимость изменения окраски АламарБлю от концентрации Международного стандарта и изучаемых образцов интерферона β в среде. В данном случае специфическая активность изучаемых образцов 1-5 оказалась выше, чем Международного стандарта.

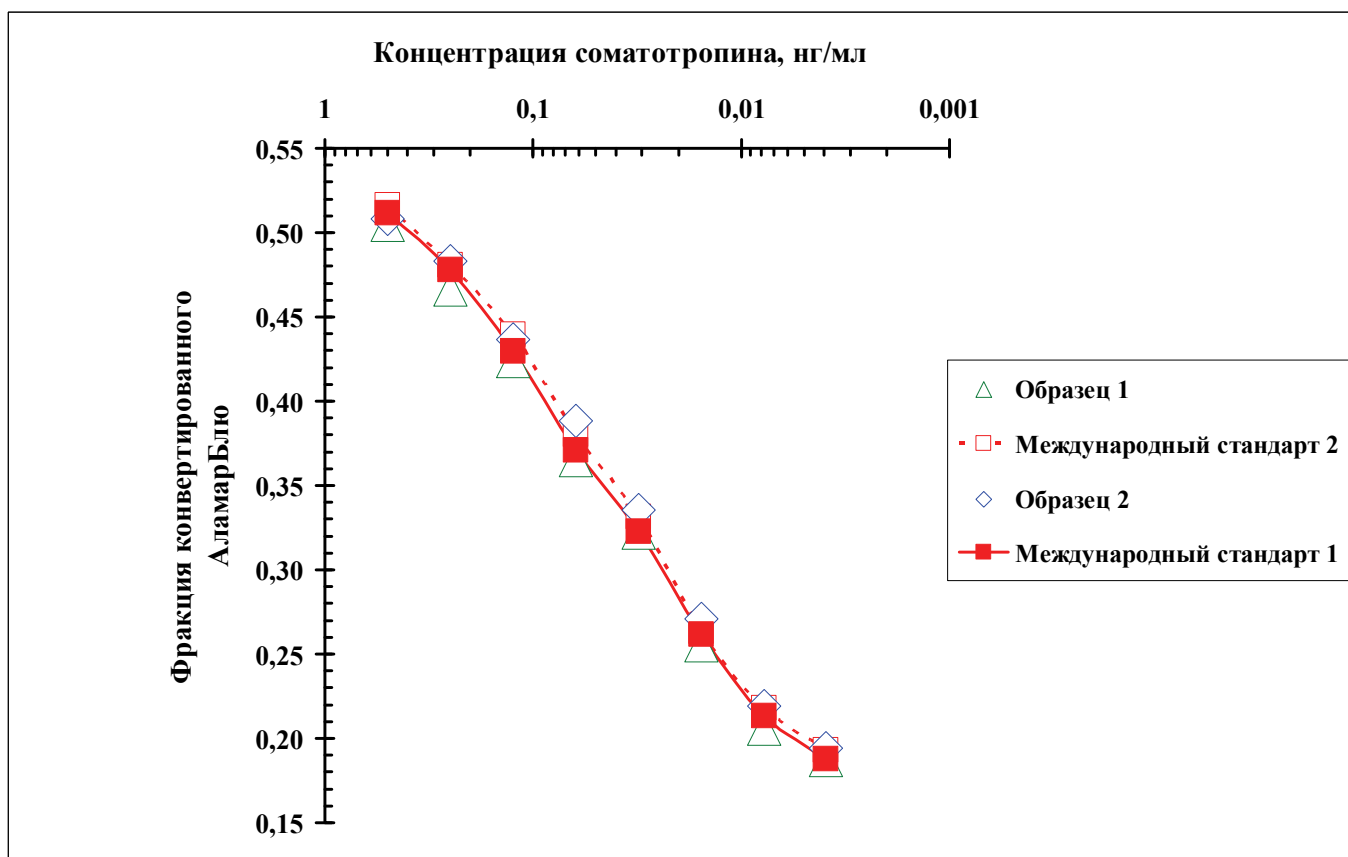


Рис. 6. Зависимость изменения окраски АламарБлю от концентрации в среде Международного стандарта и изучаемых образцов соматотропина («РАСТАНА» производства Фармстандарт–УфаВИТА), рассчитанная по данным измерения экстинкции.

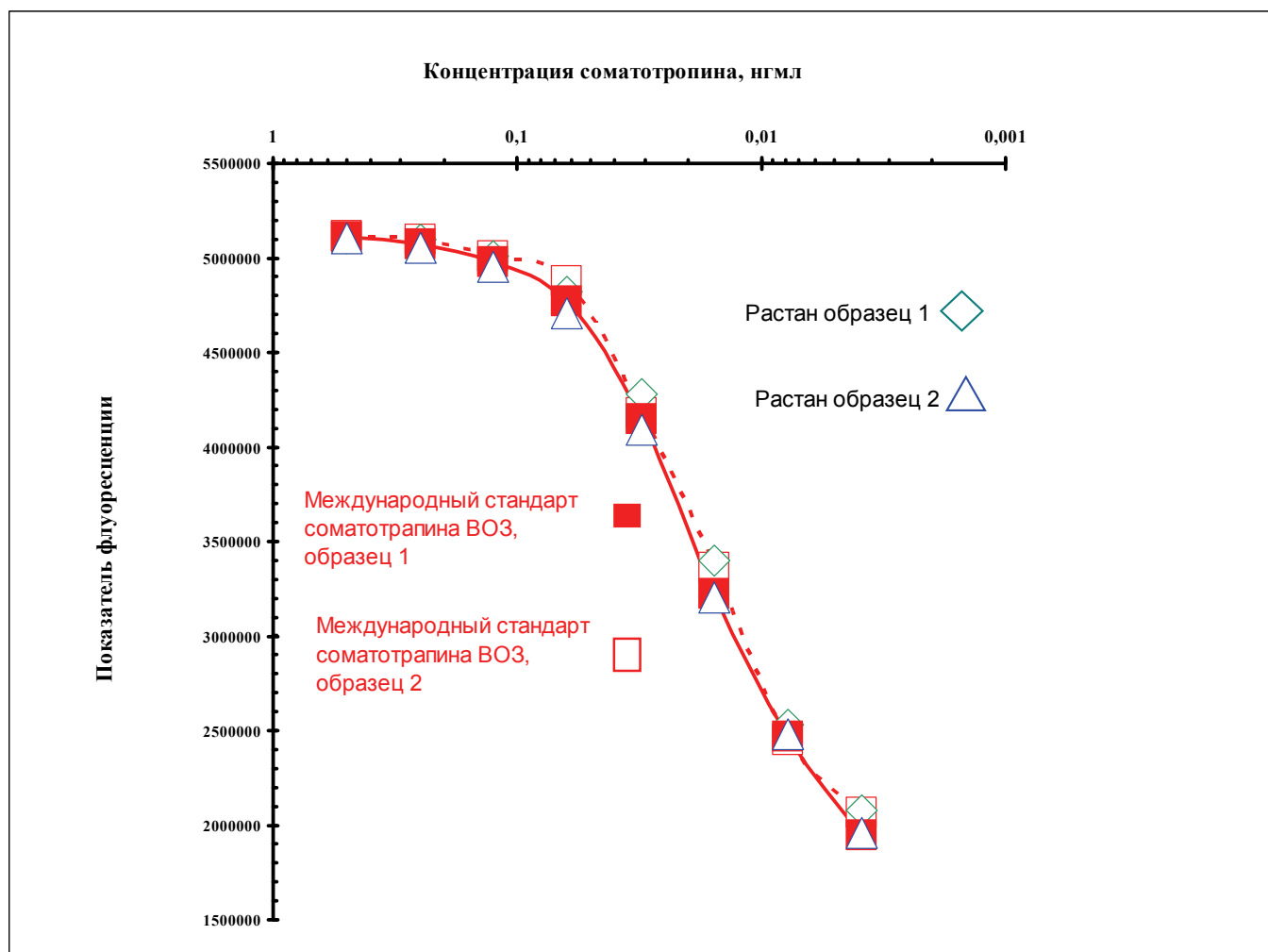


Рис. 7. Зависимость изменения флуоресценции АламарБлю от концентрации в среде Международного стандарта и изучаемых образцов соматотропина; флуоресценция измерена на тех же планшетах, для которых проведено измерение экстинкции красителя для построения графиков, представленных на рис. 6.