

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 2 Том 6 2007 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

ГУ 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, Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф.

Редколлегия

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

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

Подписной индекс 81679

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

Для медицинских учреждений бесплатно

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24
НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН
Тел.: 323 57 00, 324-10-65; факс: 324 22 74;
E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru
Интернет-версия: www.rosoncweb.ru/rbj/
ISSN электронной версии 1726-9792

Издательская группа РОНЦ:
115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.
Тел. (495) 324-2470; publisher1@cancercenter.ru

Объем 6,25 усл. печ. листов,
подписано в печать 01.06.2007
Тираж 1000 экз.

СОДЕРЖАНИЕ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОТЕРАПИЯ

Противоопухолевые вакцины на основе белков теплового шока <i>К.Д. Никитин, А.Ю. Барышников</i>	3
Регуляция апоптоза с помощью альтернативного сплайсинга матричной РНК <i>О. В. Уткин, В. В. Новиков</i>	13
Кинетика экспрессии антигенов в процессе пролиферации и дифференцировки Ph⁺-клеток периферической крови при хроническом миелолейкозе в культуре <i>Н. И. Гринева, А. Ю. Барышников, Л. П. Герасимова, Т. В. Боровикова, Г. П. Саркисян, Т. Е. Манакова, Т. В. Ахлынина, Н. П. Логачева, Н. М. Найденова</i>	21
Разработка моделей для доклинического изучения новых адресных препаратов против <i>Her2/new</i> <i>Д. В. Филоненко, Н. В. Андропова, Е. М. Трещалина, Е. В. Степанова, А. Ю. Барышников</i>	33

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОТЕРАПИЯ

Вакциноterapia метастатической меланомы с использованием дендритных клеток: клиническое исследование I/II фазы <i>И. Н. Михайлова, Н. Н. Петенко, Г. З. Чкадуа, Л. Ю. Вишнякова, Е. В. Огородникова, Г. С. Аллахвердян, Е. А. Черемушкин, К. С. Титов, С. А. Хатырев, Т. К. Харатишвили, К. А. Парсункова, М. Д. Алиев, А. Ю. Барышников, Л. В. Демидов</i>	39
---	----

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ

Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухолях <i>Д.Г. Гуревич, И.Г. Меерович, Г.А. Меерович, С.И. Воробьев, В.Г. Певгов, З.С. Смирнова, Н.А. Оборотова, Е.А. Лукьянец, А.Ю. Барышников</i>	45
Изучение кожной фоточувствительности сульфированных производных фталоцианина <i>Н. Б. Морозова, Р. И. Якубовская, В. И. Чиссов, В. М. Мизин, Г. М. Плешков</i>	50

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Иммуномодулирующая активность сублингвальной формы галавита <i>М.А. Барышникова, Н.К. Ахматова, А.М. Карамзин</i>	55
Интраоперационное болюсное введение 5-фторурацила — один из путей повышения абластичности оперативного вмешательства у больных с опухолями орофарингеальной зоны <i>И.В. Вихлянов, Я.Н. Шойхет, А.Ф. Лазарев</i>	59

УДК 616-006-085.373:577.112

*K.D. Nikitin, A.Yu. Baryshnikov***HEAT SHOCK PROTEIN-BASED ANTICANCER VACCINES***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow***ABSTRACT**

Heat shock proteins (HSP) are phylogenetically old intracellular proteins that can be found in all types of nuclear cells. The variety of HSP functions is associated with their ability to bind cellular proteins and peptides; these complexes then participate in numerous processes (protein folding and transportation, anti-stress protection, etc.). One of important properties of HSPs is their recently identified ability to potentiate the immunogenicity of bound antigenic peptides. If HSP-peptide complexes (HSP-PCs) release into extracellular space they become captured by antigenpresenting cells and induce an effective immune response. This property allows using of purified HSP-PCs for treatment and prophylaxis of infectious and oncological diseases. The proposed literature review is dedicated to molecular mechanisms of HSP-PCs immunogenicity and their use for biotherapy of cancer.

Key words: heat shock proteins, anticancer vaccines.

*К.Д. Никитин, А.Ю. Барышников***ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВАКЦИНЫ
НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА***ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***РЕЗЮМЕ**

Белки теплового шока (БТШ) – филогенетически древние внутриклеточные белки, встречающиеся во всех ядерных клетках. Многообразие функций БТШ связано с их способностью связываться с другими белками и пептидами и в виде таких комплексов участвовать в самых разнообразных клеточных процессах (фолдинг, транспортировка белков, защита клеток от стрессов и т.д.). Одним из важных свойств БТШ является открытая в последние десятилетия их способность многократно повышать иммуногенность антигенных пептидов, связанных с ними: попав во внеклеточное пространство, комплексы БТШ с пептидами (БТШ-ПК) захватываются антигенпрезентирующими клетками и вызывают эффективный иммунный ответ. Это свойство позволяет использовать очищенные БТШ-ПК для лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний. Данный обзор посвящен молекулярным механизмам иммуногенности БТШ-ПК и их применению для вакцинотерапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: белки теплового шока, противоопухолевые вакцины.

ВВЕДЕНИЕ

Несомненные успехи химиотерапии опухолей в последние годы привели к выраженному прогрессу в области лечения онкологических заболеваний. В то же время ряд опухолей по-прежнему остаются практически неизлечимы, особенно на поздних стадиях. Это, а также значительный прогресс науки в области иммунологии и молекулярной биологии обуславливает активные поиски способов иммунотерапии рака как самой по себе, так и в сочетании с другими методами лечения.

Иммунотерапия рака – направление в лечении злокачественных новообразований, основывающееся на усилении иммунного ответа на опухоль. Уже более

60 лет назад было показано в экспериментах на животных, что иммунизация сингенных мышей опухолевыми клетками делает их более устойчивыми к последующему повторному заражению этими клетками. Эти и другие эксперименты позволили сформулировать 2 важнейших принципа онкоиммунологии:

- 1) опухоли иммуногенны;
- 2) иммунитет против данной конкретной опухоли строго специфичен, т.е. каждая опухоль высоко индивидуальна по своему антигенному составу.

Первый из этих принципов отнюдь не нов – на нем основывается теория иммунного надзора Бернета, хотя убедительное подтверждение он получил относительно недавно. Второй же принцип является одно-

временно и главным аргументом в пользу возможности применения иммунотерапии, и главным препятствием на пути ее развития.

Два упомянутых принципа онкоиммунологии привели к активному поиску антигенов, индивидуальных для опухолевых клеток. Были идентифицированы многочисленные молекулы, как мембранные, так и локализованные в клеточной цитоплазме, более или менее специфичные для различных видов новообразований [52]. Многие из них в настоящее время активно используются в клинической практике для диагностики злокачественных новообразований и определения их прогноза (α -фетопротеин, PSA, мембранные антигены лейкоцитов). Однако попытки применения этих антигенов в качестве противоопухолевых вакцин пока что не увенчались успехом.

Одним из способов поиска опухолеассоциированных антигенов является разделение опухолевых гомогенатов на белковые фракции различными хроматографическими методами и иммунизация этими фракциями животных. Фракции, вызывающие протективный иммунитет против опухолевых клеток, из которых они получены, далее разделяются на еще более чистые составляющие и анализируются сходным путем до тех пор, пока не будет получен непосредственно тот белок, который и вызывает иммунитет. Подобным образом были продемонстрированы иммуногенные свойства белков теплового шока (БТШ), или, в англоязычной литературе, HSP (heat shock proteins). P.K. Srivastava et al. (1986), выделили gp96 из 2 химически индуцированных сарком и определили его как антиген, ответственный за иммуногенность изучаемых опухолей. Дальнейшие исследования показали, что белки теплового шока являются многообещающими кандидатами для использования в качестве противоопухолевых вакцин.

БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА – УБИКВИТАРНЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ БЕЛКИ

БТШ впервые были описаны A. Tissieres et al. в 1974 г. у дрожжей, подвергнутых тепловому шоку [66]. БТШ обнаруживаются во множестве внутриклеточных структур (в цитоплазме, ядре, эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях и хлоропластах), во всех ядерных клетках у всех многоклеточных организмов, начиная с самых примитивных – как у растений, так и у животных. БТШ являются одними из самых консервативных и филогенетических древних белков организма: степень гомологии между БТШ эукариот и прокариот составляет более 50 %, а некоторые домены полностью идентичны [41; 73].

Термин «белки теплового шока» не является идеальным по нескольким причинам. Во-первых, БТШ синтезируются в некотором количестве во всех тканях постоянно, вне зависимости от воздействия стрессовых факторов [21]. Во-вторых, повышение внутриклеточного синтеза БТШ происходит отнюдь не только на тепловой шок, но на любое стрессовое воздействие: внешнее (УФ, тепловой шок, тяжелые металлы,

аминокислоты), патологическое (вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции, лихорадка, воспаление, злокачественная трансформация, аутоиммунные реакции) или даже физиологическое (ростовые факторы, клеточная дифференциация, гормональная стимуляция, тканевой рост) [41].

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА

Функции БТШ в клеточном метаболизме необычайно широки и, несмотря на 30-летнюю историю интенсивного изучения, до конца не расшифрованы. Известно, что БТШ являются универсальными молекулярными шаперонами (от англ. *chaperon* – сопровождать), т.е. белками, связывающимися с другими молекулами, и в таком комплексе выполняющими определенные функции [27].

БТШ участвуют в фолдинге белков

Основной функцией БТШ считается связывание новообразующихся белков и контроль корректного формирования их третичной структуры (фолдинга): связываясь с растущими пептидными цепями еще на рибосоме, БТШ предотвращают их неспецифическую агрегацию, предохраняют от преждевременного протеолитического распада и способствуют правильному и своевременному сворачиванию полипептида в трехмерную структуру. БТШ также связывают мутантные белки или белки, чья третичная структура уже сформировалась неверно, и защищают клетку от воздействия таких белков (причем некоторые БТШ – а именно, представители семейства HSP70, обладают свойствами фермента, исправляющего неправильно сформировавшиеся белки за счет энергии АТФ) [25; 31].

БТШ – внутриклеточные транспортеры

БТШ участвуют в процессах транспортировки белковых молекул через мембраны митохондрий и ядерную оболочку [27; 32], в процессинге антигенов и связывании процессированных пептидов с молекулами МНС I класса [11; 46; 62].

БТШ препятствуют денатурации белков

При воздействии любого стрессорного фактора из перечисленных выше активность БТШ резко возрастает. БТШ в клетке, подвергнутой стрессу, интенсивно связываются с денатурирующими белками и поддерживают поврежденные белки в состоянии, способном к последующему восстановлению [38; 47]. В норме БТШ присутствуют в цитоплазме в комплексе со специальным транскрипционным фактором HSF (от англ. *heat shock factor* – фактор теплового шока). При стрессорном воздействии HSF отделяется от БТШ, образует тримеры, приобретает ДНК-связывающую активность и накапливается в ядре, где активирует транскрипцию дополнительных шаперонов и подавляет транскрипцию других генов. По прошествии стрессорного воздействия освободившиеся БТШ связывают HSF и переходят в исходное состояние.

Таким образом, синтез БТШ является универсальным неспецифическим ответом клетки на стресс, и, по современным данным, не известно такого вида клеточного стресса, при котором не происходило бы синтеза БТШ [24; 41].

БТШ и клеточная смерть

БТШ участвуют также в защите клеток от стресс-индуцируемого апоптоза, блокируя пути его активации и стабилизируя клеточные структуры [48]. Известно, что опухолевые клетки синтезируют повышенное количество БТШ [28], что предохраняет их от запуска апоптоза в ответ на стрессорные воздействия [34], а снижение синтеза БТШ в опухолях облегчает индукцию апоптоза [37] и понижает их способность к прогрессированию [26; 35].

Предполагается участие БТШ также в процессах клеточной смерти и очищения организма от некротизированных клеток. Поскольку БТШ являются широко распространенными растворимыми внутриклеточными белками, они могут служить надежными вестниками некроза, участвовать в межклеточном сигнализировании, сообщая иммунной системе о наступлении клеточной смерти и необходимости утилизации некротических масс. Эти предположения подтверждаются также наблюдениями того, что высвобождение внутриклеточных БТШ происходит только в случае гибели клетки путем некроза, но не апоптоза [7].

СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА

Выделяют 4 основных семейства БТШ:

1) *БТШ90* (HSP90) – группа высокомолекулярных БТШ, имеющих у млекопитающих молекулярную массу 90 кДа (у дрожжей 104, у дрозофил 83 кДа), наиболее изученным представителем семейства является Grp94 (Grp – от англ. glucose-regulated protein, «белок, регулируемый глюкозой») или другое его обозначение gp96 (gp – от англ. glycoprotein, гликопротеин);

2) *БТШ70* (HSP70) – семейство белков с молекулярной массой около 70 кДа, наиболее широко распространенные и лучше всего изученные БТШ млекопитающих;

3) *малые БТШ*, чей молекулярный вес варьирует от 15 до 30 кДа [4; 41];

4) *высокомолекулярные БТШ*, представителем которых является gp110.

Несмотря на общую задачу всех этих белков – обеспечение выживания клетки в условиях стресса, – функции и тканеспецифичность БТШ варьируют от группы к группе в нормальных условиях и при стрессе.

БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА УСИЛИВАЮТ ИММУНОГЕННОСТЬ АНТИГЕННЫХ ПЕПТИДОВ

В процессе поиска опухолеспецифических антигенов было установлено, что БТШ обладают определенными иммуногенными свойствами. Известно, что БТШ

не специфичны для каких-либо видов опухолей или даже для злокачественных новообразований вообще – они могут быть выделены из почти всех нормальных тканей организма. Иммуитет, вызываемый БТШ, строго специфичен и направлен только против той одной единственной опухоли, из ткани которой они были выделены.

Было предположено, что специфичность БТШ в зависимости от опухоли связана с тканевой гетерогенностью БТШ, т.е. их соматическим полиморфизмом: БТШ одного и того же организма отличаются от ткани к ткани, от нормальной ткани к опухоли и от опухоли к опухоли. Однако изучение последовательности клонированных ДНК как опухолевых, так и нормальных БТШ не подтвердило этой гипотезы [60], и, таким образом, природа иммуногенности БТШ оставалась неясна.

Поскольку препараты БТШ, использовавшиеся для определения их иммуногенности, были одинаковы по всем критериям, было предположено, что за специфическую иммуногенность разных образцов БТШ отвечают не собственно БТШ, а некие вещества, ассоциированные с БТШ, но не определяемые стандартными методами [58]. Предположение это получило неожиданное подтверждение. Было обнаружено большое количество пептидов, ассоциированных с Hsp70 [33; 39], а удаление их из препаратов Hsp70 лишило последних иммуногенных свойств [67].

В большом количестве работ было показано, что БТШ могут связывать фрагменты практически любых белков, как эндогенных, так и экзогенных, как природных, так и модельных.

Так, D. Arnold et al. (1997) [2] показали, что иммунизация белком gp96, полученным из клеток, трансфицированным геном β -галактозидазы, вызывает цитотоксический иммунитет против определенного эпитопа β -галактозидазы. Аналогично иммунизация белком gp96 из клеток, экспрессирующих определенные антигены малого комплекса гистосовместимости, вызывает цитотоксический иммунитет против этих антигенов.

T.J. Nieland et al. (1996) [50] идентифицировали вирусный эпитоп, ассоциированный с gp96, выделенным из клеток, инфицированных этим вирусом; данный эпитоп не определялся с БТШ, выделенными из не инфицированных данным вирусом клеток. N.E. Blachere et al., (1997) [16] воспроизвели *in vitro* комплексы gp96-пептид и Hsp70-пептид и показали на примере широкого спектра пептидов, что БТШ и пептиды сами по себе не вызывают иммунного ответа, но их комплексы (БТШ-пептидные комплексы, БТШ-ПК) вызывают пролиферацию цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов. Сходные результаты были получены и в других исследованиях [20; 49; 72].

Принципиально важным представляется тот факт, что из БТШ-ПК, полученных из опухолевых клеток, выделяются и опухолевые антигены: Melan-A/MART-1 для меланомы, CEA и EpCAM в случае колоректального рака и некоторые другие [17; 51; 55].

Способность БТШ к связыванию пептидов также подтверждается структурными исследованиями S. Vogen et al., 2002 [70], N.A. Linderth et al., 2000 [40], X. Zhu et

al., 1996 [74], в которых было показано наличие пептид-связывающих карманов в молекулах Hsp70 и gp96. Предполагается, что наличие пептид-связывающих структур в молекулах БТШ важно как для выполнения ими шаперонных внутриклеточных функций, так и для участия в процессах межклеточного взаимодействия при иммунных реакциях [63]. В то же время, несмотря на значительное число исследований, структурные требования для связывания пептидов с БТШ остаются окончательно не известными, поскольку первичные аминокислотные последовательности пептидов, элюированных из комплексов с БТШ, весьма различны.

Было показано, что макрофаги (но не В-лимфоциты), фибробласты и другие АПК захватывают БТШ-ПК, выделяют из них непосредственно антигенные пептиды и презентуют их на своей поверхности эффекторным клеткам иммунной системы в комплексе с молекулами МНС I и II класса [16; 18; 23; 30; 59; 61; 64]. АПК, активированные БТШ-пептидными комплексами, вызывают активацию клеточного и гуморального иммунных ответов против антигенов опухолей, из которых эти БТШ-ПК выделены. Этот процесс «репрезентации» (т.е. выделения антигенных детерминант из комплексов с одними молекулами и презентация в комплексах с другими) включает в себя перемещение антигенных пептидов по определенным внутриклеточным структурами [12] и сопровождается также синтезом широкого спектра цитокинов и костимулирующих молекул [8].

Помимо активации CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов, иммунизация белками теплового шока вызывает и NK-ответ, что представляется важнейшим механизмом протективного противоопухолевого иммунитета. Вероятно, активация NK-ответа также является следствием синтеза цитокинов антигенпрезентирующими клетками и, в первую очередь, интерлейкина-12. В конечном итоге репрезентированные в комплексе с молекулами МНС I и II классов антигенные пептиды вызывают специфическую активацию иммунного ответа.

Таким образом, иммуногенность полученных из опухолевых образцов БТШ-пептидных комплексов зависит от связанных с последними пептидов. БТШ не иммуногены сами по себе, но являются эволюционно сформировавшимся физиологическим механизмом усиления иммуногенности чужеродных белков, попавших в организм или образовавшихся в нем.

РЕЦЕПТОРЫ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК К БТШ-ПК

Первый ключ к разгадке механизмов, посредством которых иммунизация БТШ-ПК вызывает активацию антиген-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов, был найден в исследованиях, которые показали, что инициация иммунного ответа с помощью БТШ-ПК исключительно чувствительна к нормальному функционированию фагоцитирующих клеток, но не зависит от CD4⁺ Т-лимфоцитов [68]. Это наблюдение, а также тот факт, что даже чрезвычайно малые количества БТШ-ПК вызывают специфический иммунный ответ, привели к предположению о

существовании рецепторов к БТШ-ПК на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК) [60]. Свидетельства существования рецептора (или рецепторов) к БТШ-ПК были получены независимо несколькими группами исследователей [3; 14; 57; 71].

Первым из таких рецепторов был идентифицирован CD91, он же рецептор α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) [15; 44]. Впоследствии в качестве подобных рецепторов были предложены также молекулы LOX1 [22], TLR2 и TLR4 [6; 69], CD14 [5].

Наиболее изученным на сегодняшний день является взаимодействие БТШ-ПК с CD91. Связывание gp96-ПК с CD91 ведет к погружению (интернализации) комплекса в клетку и через последующие внутриклеточные события к презентации антигенного пептида в комплексе с молекулами МНС I и II классов [44]. Моноклональные антитела к CD91 и α_2 -МГ ингибируют иммуногенные свойства gp96-ПК. Кроме того, экспрессия CD91 коррелирует со способностью АПК репрезентировать пептиды из gp96-ПК [9; 13].

Следует отметить, что в одном из исследований не было получено подтверждения роли CD91 как рецептора к БТШ-ПК [12], однако это противоречие позднее было объяснено особенностями использованных экспериментальных методик [13].

TLR (от англ. «toll-like receptors») – группа рецепторов на поверхности клеток иммунной системы, осуществляющая неспецифическое распознавание патогенов: TLR2 распознает пептидогликан бактериальной клеточной стенки, TLR4 – липополисахарид, TLR9 – бактериальную ДНК [1; 29], и, таким образом, эти рецепторы участвуют в процессах активации врожденного иммунитета. Первоначально было установлено, что БТШ, известный как HSP60, не активирует не несущие TLR4 макрофаги мышей линии С3Н/HeJ [53]. В дальнейшем было показано, что генетическая модификация таких клеток генами *TLR2* или *TLR4* возвращает им возможность активации в ответ на HSP60. R.M. Vabulas et al., 2002 [69] показали, что в ответ на связывание gp96 с TLR2 и TLR4 (но не TLR3, TLR7 и TLR8) дендритные клетки начинают синтезировать IL-12 и фактор некроза опухолей α , на их поверхности повышается экспрессия CD86 и CD40, а в самой клетке происходит активация NF- κ B сигнального пути и ряда ферментов, что в целом свидетельствует о созревании клеток.

Предполагается, что между функциями этих рецепторов существует принципиальная разница. С помощью CD91 и LOX1 происходит транспорт антигенных пептидов, находящихся в комплексе с БТШ, через межклеточное пространство и клеточные мембраны. При связывании БТШ-ПК с CD14, TLR2 или TLR4 не происходит их интернализации, но запускается каскад внутриклеточного сигнализирования, в результате которого транскрипционный фактор NF- κ B перемещается в ядро и происходит синтез клеткой широкого спектра провоспалительных цитокинов и костимулирующих молекул, способствующих дальнейшему развитию иммунного ответа [8].

Другие детали механизмов активации иммунного ответа при иммунизации БТШ – такие, как природа структур макрофагов, участвующих в захвате БТШ-ПК, механизмы транспортировки БТШ-ПК в эндоплазматический ретикулум, зависимость этих процессов от протеасом и, наконец, дальнейшая судьба самого gp96 – по-прежнему остаются неясны. Также остаются не изученными иммуногенность и механизмы действия других БТШ-ПК, хотя в этом направлении ведутся интенсивные исследования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ

Детальное изучение свойств и функций БТШ открывает новые перспективы в иммунотерапии рака.

Несмотря на то, что большое количество опухолеассоциированных антигенов было идентифицировано в последние годы [52], их использование как противоопухолевых вакцин остается малоэффективным по ряду причин: слишком велико количество антигенных пептидов, формирующих иммуногенность опухоли; слишком мала вероятность обнаружения одного и того же антигенного пептида в большом количестве различных опухолей; слишком мал вклад одного антигена в общую иммуногенность опухоли.

В то же время исследования последних лет показывают, что БТШ, выделенные из опухолевых клеток, находятся в комплексе с широким спектром клеточных пептидов и теоретически могут нести в себе все антигены, присутствующие в данной конкретной опухоли, весь ее антигенный репертуар. Соответственно становится весьма привлекательной попытка применения аутологических противоопухолевых вакцин на основе очищенных БТШ-ПК.

Действительно, на сегодняшний день уже существуют первые, и довольно убедительные, подтверждения данных гипотез.

Первые исследования эффективности вакцинации аутологичными БТШ-ПК у людей были проведены S. Janetzki et al., 2000, [36] на примере небольшой группы различных опухолей. Авторы отметили признаки клинического улучшения и активации Т-клеточного противоопухолевого ответа у части больных. Далее было инициировано крупное рандомизированное исследование безопасности и эффективности применения аутологических БТШ-ПК на основе gp96 (HSPPC-96; Oncophage) в качестве противоопухолевой вакцины; исследование включило в себя 45 больных диссеминированной меланомой из 4 итальянских медицинских центров [10]. В целом исследование было организовано следующим образом: хирургически удаленные метастазы опухоли замораживались в жидком азоте и отправлялись в лабораторию на территории США, где из полученных образцов в полном соответствии с критериями GMP (Good Manufacturing Practice) выделялись и очищались БТШ-ПК, которые после тщательного контроля качества упаковывались и отсылались обратно лечащим врачам. Больные были рандомизированы в группы, получавшие 5 или 50 мг

HSPPC-96 в нед. Подкожные инъекции HSPPC-96 производились начиная с 5–8 нед после хирургического удаления метастазов.

Через 4 нед (4 инъекции – 1 цикл лечения) 39 из 45 пациентов были признаны подходящими для оценки результатов терапии, из них 28 больных имели явления остаточной болезни, в то время, как 11 больных оставались клинически здоровы после хирургического лечения. Среди пациентов с явлениями остаточной болезни были отмечены 2 случая полного ответа (24 и ≥ 48 мес) и 3 случая длительной стабилизации клинического течения заболевания (153; 191 и 272 дня). Период, свободный от заболевания, в группе больных, получавших вакцинацию, варьировал от 29 до 642 дней и составил в среднем 117 дней. Не было обнаружено влияния дозы HSPPC-96 на клинический эффект вакцинации и не отмечалось какой-либо системной токсичности препарата, за исключением незначительной эритемы и уплотнения в месте инъекции у некоторых больных. Иммунологическими методами у 11 из 23 больных, получавших вакцинацию (в том числе и у больных, продемонстрировавших клинический эффект вакцинации), была отмечена активация специфического противоопухолевого ответа (синтез интерферона- γ мононуклеарами периферической крови в ответ на сокультивацию с аутологичными опухолевыми клетками).

Другое клиническое исследование возможностей применения БТШ-ПК было проведено среди больных с метастазами колоректального рака в печень [45]. Пациенты, у которых развились метастазы в печень после первичного лечения их основной опухоли, подвергались полной резекции метастазов, и из удаленных тканей готовились БТШ-ПК (HSPPC-96) для вакцинации по описанному выше методу. В целом полученные результаты сопоставимы с таковыми при применении различных химиотерапевтических схем, хотя переносимость иммунотерапии значительно лучше. Следует отметить значительно лучшие клинические результаты у тех больных, у которых в ответ на вакцинацию развился иммунный ответ (17 из 29): у таких больных наблюдалось статистически достоверное увеличение 2-летней выживаемости.

Помимо описанных выше исследований к настоящему времени уже проведены или продолжаются другие исследования вакцинации БТШ-ПК в качестве моно- или адъювантной терапии опухолей, в которые вовлечены свыше 150 медицинских центров. Проводится III фаза клинических исследований вакцины на основе БТШ-ПК в лечении рака почки, I и II фазы исследований аутологических БТШ-ПК для терапии хронического миелолейкоза, неходжкинских лимфом, немелкоклеточного рака легкого, рака желудка и поджелудочной железы (см. таблицу). Исследуется возможность применения БТШ-ПК в сочетании с гранулоцит-моноцит колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) и интерфероном- $\alpha 2b$. [54]

Безопасность применения вакцин на основе БТШ-ПК тщательно изучалась в каждом исследовании в

Клинические исследования БТШ-ПК в качестве противоопухолевых вакцин [54]

Фаза исследования	Заболевание	Тип вакцины	Характеристика пациентов	Количество пациентов
I	Различные опухоли	HSPPC-96	IV стадия, при неэффективности других методов лечения	16
I	ХМЛ	HSPPC-70	Хроническая стадия	20
II	ХМЛ	HSPPC-70	Хроническая стадия	40
II	KPP	HSPPC-96	IV стадия, после радикального хирургического лечения	40
I/II	Рак желудка	HSPPC-96	Распространенный	20
I/II	Меланома	HSPPC-96	III-IV стадия	36
II	Меланома	HSPPC-96	IV стадия, при неэффективности других методов лечения	45
III	Меланома	HSPPC-96	IV стадия, нелеченая	Предполагается 350, исследование продолжается
II	НХЛ	HSPPC-96	Низкой степени дифференцировки	17, исследование продолжается
I	РПЖ	HSPPC-96	I-III стадия	10
I/II	ПКК	HSPPC-96	IV стадия	38
II	ПКК	HSPPC-96	IV стадия	72
III	ПКК	HSPPC-96	I-IV стадия, после нефрэктомии, высокий риск рецидива	Предполагается 650, исследование продолжается

ХМЛ – хронический миелолейкоз; KPP – колоректальный рак; НХЛ – неходжкинская лимфома; РПЖ – рак поджелудочной железы; ПКК – почечно-клеточная карцинома; HSPPC-96 – вакцина на основе gp96; HSPPC-70 – вакцина на основе HSP-70

связи с теоретической возможностью развития аутоиммунных реакций, однако среди более, чем 800 пролеченных на сегодняшний день больных не было сообщено случаев серьезных клинических или лабораторных свидетельств аутоиммунных реакций. Вакцины на основе БТШ-ПК хорошо переносятся, и побочные эффекты от их введения обычно ограничиваются местными реакциями или незначительным повышением температуры.

Применение вакцин на основе БТШ-ПК ограничивается, во-первых, необходимостью хирургического получения образца опухолевой ткани (желательно не менее 3 г для приготовления непосредственно вакцины и, как правило, еще 1–2 г – для проведения дополнительных исследований) и, во-вторых, значительными затратами времени на приготовление вакцины, что может привести к неэффективности и даже бессмысленности терапии (например, при прогрессировании заболевания). В целях преодоления этих препятствий разрабатываются новые подходы, например, получение рекомбинантных БТШ [42] или генетическая модификация опухолевых клеток [43]. Другими разрабатываемыми подходами являются

вакцинация белками теплового шока, выделенными из бактериальных клеток или нормальных тканей и связанными с антигенными пептидами *in vitro* [16; 56], создание химерных белков путем слияния БТШ и антигенных пептидов [19; 65]. Однако эти методы имеют ряд существенных недостатков (необходимость выделения отдельных опухолеспецифических антигенов и в то же время утрата всего широкого спектра неидентифицированных опухолеспецифических антигенов, присущих БТШ-ПК, полученных непосредственно из опухоли) и определение наиболее эффективных и целесообразных методов использования БТШ-ПК является задачей исследований будущего.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительный прогресс онкологии и иммунологии внушает надежду на возможность успешной иммунотерапии злокачественных заболеваний. На основе последних достижений молекулярной биологии уже внедрены в практику и успешно применяются многочисленные методики и препараты, значительно улучшившие диагностику и лечение рака. Одним из наиболее многообещающих открытий последних десяти-

летий стало обнаружение иммуногенных свойств белков теплового шока и расшифровка их роли в иммунной системе.

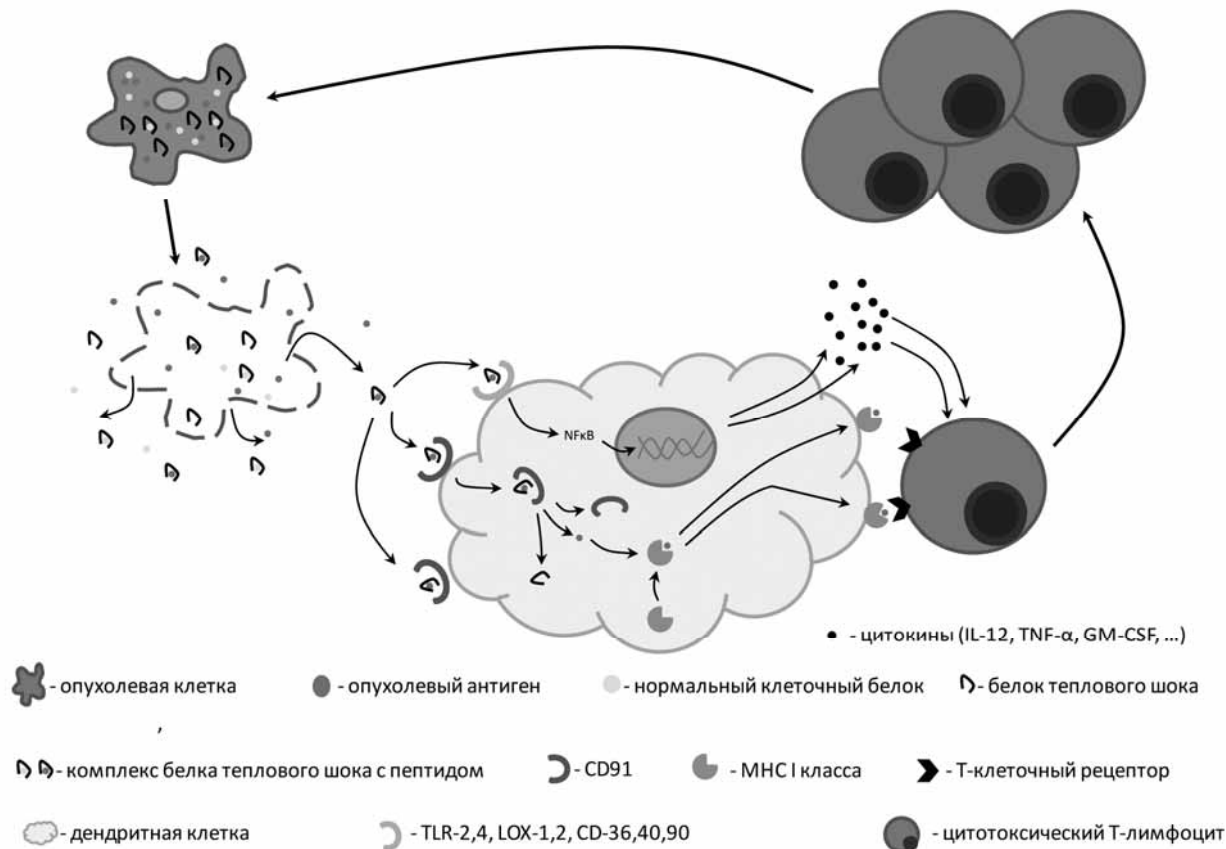
БТШ являются повсеместно распространенными молекулярными шаперонами, выполняющими многочисленные внутриклеточные функции. БТШ клетки образуют комплексы со всеми возможными пептидами, синтезирующимися в клетке как с нормальными, так и с чужеродными, мутантными или патологически измененными. В случае гибели клетки, в особенности по некротическому механизму, комплексы БТШ и внутриклеточных пептидов (БТШ-ПК) попадают во внеклеточное пространство и становятся доступными для клеток иммунной системы. На поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК) предполагается существование нескольких типов специфических рецепторов к БТШ-ПК. Одни из них (CD91 и, возможно, LOX-1) опосредуют погружение БТШ-ПК в эндоплазматический ретикулум АПК, где происходит диссоциация БТШ-ПК на БТШ и пептиды. Последние в дальнейшем связываются с молекулами МНС I и, возможно, II классов и репрезентируются на поверхности АПК для распознавания эффекторными клетками иммунной системы – Т-лимфоцитами. Другие рецепторы (предположительно TLR2, TLR4, CD14) связываются с БТШ-ПК, что ведет к запуску каска-

дов внутриклеточного сигналинга, к активации АПК и синтезу ими широкого спектра цитокинов, преимущественно провоспалительных. В конечном итоге выход БТШ-ПК во внеклеточное пространство ведет к активации как врожденного (NK-клетки), так и адаптивного (цитотоксические лимфоциты) иммунитета (см. рисунок).

Было предположено, что БТШ-ПК, полученные из опухолей, содержат не только нормальные пептиды, присущие всем тканям данного больного, но и все уникальные опухолеспецифические антигены, присущие данной опухоли. Это послужило предпосылкой для исследования возможности создания аутологических противоопухолевых вакцин на основе БТШ-ПК. Экспериментальные и клинические исследования подтверждают возможность терапии злокачественных опухолей противоопухолевыми вакцинами на основе аутологических БТШ-ПК, их безопасность и определенную эффективность, однако для определения их реальной терапевтической ценности требуются дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aderem, A., and Ulevitch, R. J. // Nature – 2000. – Vol. 406. – P. 782–7.
2. Arnold D., Wahl C., Faath S. et al. Influences of



Механизм развития цитотоксического иммунного ответа на комплексы белков теплового шока с антигенными пептидами

transporter associated with antigen processing (TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 186. – P. 461–6.

3. *Arnold-Schild D., Hanau D., Spehner D. et al.* Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 3757–60.

4. *Arrigo A.-P., Landry J.* Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins / *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* / Eds R.I. Morimoto, A. Tissieres, C. Georgopoulos. Cold Spring Harbor Lab. Press, 1994. – P. 335–78.

5. *Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A. et al.* Hsp70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 435–42.

6. *Asea A., Rehli M., Kabingu E. et al.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 15028–34.

7. *Basu S., Binder R.J., Suto R. et al.* Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NKkB pathway // *Intl. Immunol.* – 2000. – Vol. 12, No. 11. – P. 1539–46.

8. *Basu S., Suto R., Binder R.J., Srivastava P.K.* Heat shock proteins as novel mediators of cytokine secretion by macrophages // *Cell Stress Chaperones.* – 1998. – Vol. 3. – P. 11.

9. *Basu S., Binder R. J., Ramalingam T., Srivastava P. K.* // *Immunity.* – 2001. – Vol. 14. – P. 303–13.

10. *Belli F., Testori A., Rivoltini L. et al.* Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 4169–80.

11. *Berwin B., Rosser M.F., Brinker K.G., Nicchitta C.V.* Transfer of GRP94(gp96)-associated peptides onto endosomal MHC class I molecules // *Traffic.* – 2002. – Vol. 3. – P. 358–66.

12. *Berwin B., Hart J.P., Pizzo S.V., Nicchitta C.V.* Cutting Edge: CD91-Independent Cross-Presentation of GRP94(gp96)-Associated Peptides // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 4282–86.

13. *Binder R.J., Srivastava P.K.* Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 6128–33.

14. *Binder R.J., Harris M.L., Menoret A., Srivastava P.K.* Saturation, competition and specificity in interaction of heat shock proteins (hsp) gp96, hsp90 and hsp70 with CD11b⁺ cells // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 2582–7.

15. *Binder R.J., Han D.K., Srivastava P.K.* CD91: a receptor for heat shock protein gp96 // *Nat. Immunol.* – 2000. – Vol. 1. – P. 151.

16. *Blachere N.E., Li Z., Chandawarkar R.Y. et al.* Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit

peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 186. – P. 1315–22.

17. *Castelli C., Ciupitu A.M., Rini F. et al.* Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate anti-melanoma T cells // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 222–7.

18. *Castellino F., Boucher P.E., Eichelberg K. et al.* Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 191. – P. 1957–64.

19. *Cho B.K., Palliser D., Guillen E. et al.* A proposed mechanism for the induction of cytotoxic T lymphocyte production by heat shock fusion proteins // *Immunity.* – 2000. – Vol. 12. – P. 263–72.

20. *Ciupitu A., Peterson M., O'Donnell C. et al.* Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity specific cytotoxic T lymphocytes // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187. – P. 685.

21. *Craig, E. A., Gross, C.A.* // *Trends Biochem. Sci.* – 1991. – Vol. 16. – P. 135–40.

22. *Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J. et al.* Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation // *Immunity* – 2002. – Vol. 17. – P. 353–62.

23. *Doody A.D.H., Kovalchin J.T., Mihalyo M.A. et al.* Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8⁺T cell effector function // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 6087.

24. *Feder M.E., Parsell D.A., Lindquist S.* The stress response and stress proteins // *Cell Biology of Trauma.* Boca Raton: CRC Press – 1995. – P. 177–91.

25. *Freeman B.C., Morimoto R.I.* The human cytosolic molecular chaperones in hsp90, hsp70 (hsc70) and hsp1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15. – P. 2969–79.

26. *Gurbuxani, S., Bruey, J.M., Fromentin, A. et al.* Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells // *Oncogene* – 2001. – Vol. 20. – P. 7478–85

27. *Hartl F.U.* Molecular chaperones in cellular protein folding // *Nature.* – 1996. – Vol. 381. – P. 571–9.

28. *Heike M., Frenzel C., Meier D., Galle P.R.* Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer // *Int. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 86. – P. 489–93.

29. *Hemmi H. et al.* // *Nature* – 2000. – Vol. 408. – P. 740–5.

30. *Hilf N., Singh-Jasuja H., Schild H.J.* The heat shock protein gp96 links innate and specific immunity // *Int. J. Hyperthermia.* – 2002. – Vol. 18. – P. 521–33.

31. *Hohfeld J., Hard F.-U.* Posttranslational protein import and folding // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 1994. – Vol. 6. – P. 499–509.

32. *Horst M., Opplige W., Rospert S. et al.* Sequence action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16. – P. 1842–9.

33. Ishii T. *et al.* Isolation of MHC Class I-Restricted Tumor Antigen Peptide and Its Precursors Associated with Heat Shock Proteins hsp70, hsp90, and gp96 // *The Journal of Immunology*. – 1999. – Vol. 162. – P. 1303–9.
34. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer // *Exp. Cell Res.* – 1999. – Vol. 248 — P. 30–43.
35. Jamora C., Dennert G., Lee A.S. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1996. – Vol. 93. – P. 7690–4.
36. Janetzki S., Polla D., Rosenhauer *et al.* Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96: a pilot study // *Intl. J. Cancer*. – 1996. – Vol. 88. – P. 232–8.
37. Kaur J., Ralhan R. Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells // *Int. J. Cancer* – 2000. – Vol. 85. – P. 1–5.
38. Lee G.J., Roseman A.M., Saibil H.R., Vierling E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state // *EMBO J.* – 1997. – V. 16. – P. 659–71.
39. Li Z., Srivastava P.K. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12. – P. 3143–51.
40. Linderoth N.A., Popowicz A., Sastry S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94) // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 5472–7.
41. Lindquist S., Craig E. The heat-shock proteins // *Annu. Rev. Genet.* – 1988. – Vol. 22. – P. 631–77.
42. Manjili M.H., Henderson R., Wang X.-Y. *et al.* Development of a recombinant HSP110-HER-2/neu vaccine using the chaperoning properties of HSP110 // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 1737–42.
43. Massa C., Guiducci C., Arioli I. *et al.* Enhanced efficacy of tumor cell vaccines transfected with secreted hsp70 // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64 – P. 1502–8.
44. Matsuke T., Srivastava P. CD91 is involved in MHC class II presentation of gp96-chaperoned peptides // *Cell Stress Chaperones*. – 2000. – Vol. 5. – P. 378.
45. Mazzaferro V., Coppa J., Carabba M. *et al.* Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer // *Clin. Cancer. Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 3235–45.
46. Menoret A., Li Z., Niswonger M.L. *et al.* An Endoplasmic Reticulum Protein Implicated in Chaperoning Peptides to Major Histocompatibility of Class I Is an Aminopeptidase // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – No. 36. – P. 33313–18.
47. Miyata Y., Yahara I. The 90 kDa heat shock protein Hsp90 binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 7042–7.
48. Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L. *et al.* Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis // *Mol. Cell. Biol.* – 1997. – Vol. 17. – P. 5317–27.
49. Navaratnam M., Deshpande M.S., Hariharan M.J. *et al.* Heat shock protein-peptide complexes elicit cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses specific for bovine herpesvirus 1 // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19. – P. 1425–34.
50. Nieland T.J., Tan M.C., Monne-van Muijen M. *et al.* Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1996. – Vol. 93. – P. 6135–9.
51. Noessner E., Gastpar R., Milani V. *et al.* Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169. – P. 5424–32.
52. Novellino L., Parmiani G., Castelli C. A listing of human tumor antigens: March 2004 update // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2004. – Aug 7.
53. Ohashi K., Burkart V., Flohe S., Kolb H. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 558–61.
54. Parmiani G., Testori A., Maio M. *et al.* Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10. – P. 8142–6.
55. Rivoltini L., Castelli C., Carrabba M. *et al.* Human tumor-derived heat shock protein gp96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 3467–74.
56. Roman E., Moreno C. Synthetic peptides non-covalently bound to bacterial hsp70 elicit peptide-specific T-cell responses *in vivo* // *Immunology* – 1996. – Vol. 88. – P. 487–92.
57. Singh-Jasuja H., Toes R.E., Spee P. *et al.* Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 191. – P. 1965–74.
58. Srivastava P.K., Maki R.G. Stress induced proteins in immune response to cancer // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* – 1991. – Vol. 167. – P. 109–23.
59. Srivastava P.K., Udono H., Blachere N.E., Li Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming // *Immunogenetics*. – 1994. – Vol. 39 – P. 93–8.
60. Srivastava P.K. Peptide-binding heat shock proteins in the endoplasmic reticulum: role in immune response to cancer and in antigen presentation // *Adv. Cancer. Res.* – 1993. – Vol. 62. – P. 153–77.
61. Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 395.
62. Srivastava P.K., Udono H., Blachere N.E., Li Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming // *Immunogenetics*. – 1994. – Vol. 39. – P. 93.
63. Srivastava P.K., Menoret A., Basu S. *et al.* Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world // *Immunity*. – 1998. – Vol. 8. – P. 657–65.

64. Staib F., Distler M., Bethke K. *et al.* Cross-presentation of human melanoma peptide antigen MART-1 to CTLs from in vitro reconstituted gp96/MART-1 complexes // *Cancer Immun.* – 2004. – Vol. 4. – P. 3–17.
65. Suzue K., Zhou X., Eisen H.N., Young R.A. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 13146–51.
66. Tissieres A., Mitchell H.K., Tracy U.M. // *J. Mol. Biol.* – 1974. – Vol. 84. – P. 389–98.
67. Udon H., Srivastava P.K. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity // *J. Exp. Med.* – 1993. – Vol. 178. – P. 1391–6.
68. Udon H., Levey D.L., Srivastava P.K. Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8⁺ T cells *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 3077.
69. Vabulas R.M., Braedel S., Hilf N. *et al.* The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the toll-like receptor 2/4 pathway // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 20847–53.
70. Vogen S., Gidalevitz T., Biswas C. *et al.* Radicol-sensitive peptide binding to the N-terminal portion of GRP94 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 40742–50.
71. Wassenberg J.J., Dezfulian C., Nicchitta C.V. Receptor mediated and fluid phase pathways for internalization of the ER Hsp90 chaperone GRP94 in murine macrophages // *J. Cell. Sci.* – 1999. – Vol. 12(pt 13) – P. 2167–75.
72. Wells A., Rai S., Salvato M. *et al.* Hsp 72-mediated augmentation of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation // *Int. Immunol.* – 1998. – Vol. 10. – P. 609.
73. Yura T., Nagai H., Mori H. Regulation of the heat-shock response in bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1993. – Vol. 47. – P. 321–50.
74. Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F. *et al.* Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK // *Science* – 1996. – Vol. 272. – P. 1606–14.

Поступила 23.11.2006.

УДК 616.65-006.6-074:547.96

O.V. Utkin, V.V. Novikov

APOPTOSIS REGULATION BY ALTERNATIVE SPLICING PRE-mRNA

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

ABSTRACT

In the review the molecular mechanisms of apoptosis regulation via alternative splicing have been shown. The relevance of the problem is observed due correlation between disorders in the regulation of alternative splicing, apoptotic processes and cancer development. The main pathways of apoptosis regulation by alternative mRNA precursor splicing are described. Different variants of apoptotic program modulation by splicing factors have been shown. The review gives the evaluation of some splicing factors role in apoptotic signals regulation.

Key words: apoptosis, alternative splicing.

O.B. Уткин, В.В. Новиков

РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА С ПОМОЩЬЮ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА МАТРИЧНОЙ РНК

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

РЕЗЮМЕ

В обзоре представлены молекулярные механизмы регуляции апоптоза факторами, участвующими в реализации альтернативного сплайсинга матричной РНК. Актуальность проблемы определяется взаимосвязью между нарушениями регуляции апоптоза с помощью альтернативного сплайсинга мРНК и развитием онкологических заболеваний. В обзоре рассматриваются основные пути регуляции апоптотического каскада и альтернативного сплайсинга. Показаны различные варианты модуляции апоптотической программы разнообразными факторами сплайсинга. Дана оценка роли отдельных факторов сплайсинга в регуляции апоптотических сигналов.

Ключевые слова: апоптоз, альтернативный сплайсинг.

ВВЕДЕНИЕ

Альтернативный сплайсинг пре-мРНК является универсальным механизмом регуляции экспрессии генов и функционального разнообразия белковых продуктов. В настоящее время установлено, что почти половина генов человека подвергаются альтернативному сплайсингу, в том числе и гены, участвующие в реализации апоптоза. В связи с исключительной важностью событий альтернативного сплайсинга в реализации разнообразных функций клетки нарушения его регуляции часто сопровождаются развитием заболеваний. Дефекты регуляции альтернативного сплайсинга апоптоз-специфических генов могут участвовать в развитии онкологических заболеваний.

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ АПОПТОЗА

Программа апоптотической гибели клеток инициируется множеством разнообразных стимулов [2]. Рецептор-опосредованный путь передачи апоптотиче-

ского сигнала (внешний путь) осуществляется при участии представителей суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли и их лигандов, локализованных на поверхностной мембране клеток. Взаимодействие рецепторов смерти и их лигандов приводит к олигомеризации рецептора, ассоциации адапторных молекул и активации инициаторных каспаз. Впоследствии инициаторные каспазы протеолитически активируют эффекторные каспазы, которые вызывают деградацию клеточных субстратов (рис. 1, А).

Митохондриальный (внутренний) путь требует непосредственного участия митохондрий и взаимодействия целого ряда проапоптотических факторов. В реакциях на апоптотические стимулы действие представителей семейства Bcl-2 белков вызывает пермеабиллизацию внешней митохондриальной мембраны и выход цитохрома С. В дальнейшем цитохром С связывает адапторный белок Araf-1, индуцируя его конформационные взаимодействия, необходимые для

присоединения инициаторной прокаспазы-9. В результате формируется каспазо-активирующий комплекс (апоптосома), в составе которого активируется каспаза-9. Активная каспаза-9 инициирует активацию эффекторной каспазы-3, что способствует развитию апоптотической программы (рис.1, Б).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЭФФЕКТОРЫ АПОПТОЗА

Индукция апоптоза и активация проапоптотических белков ведет к активации каспаз (цистеиновых аспартат-специфичных протеиназ). Различают инициаторные и эффекторные каспазы [9]. Инициаторные каспазы протеолитически активируют эффекторные каспазы, которые вызывают деградацию специфических субстратов клетки с образованием в конечном итоге апоптотических телец.

Важными регуляторами апоптотического каскада являются представители белкового семейства Bcl-2. Члены этого семейства характеризуются наличием от 1 до 4 консервативных ВН (Bcl-2-homology) доменов [2; 36]. Антиапоптотические факторы семейства Bcl-2 имеют в своем составе все 4 домена. К ним относятся Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1. Проапоптотические члены этого семейства делят на 2 группы. 1-я группа включает мультидоменные белки Bax, Bak, Bok, содержащие в своем составе ВН1, ВН2 и ВН3 домены. 2-я группа включает молекулы, содержащие только домен ВН3, например Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa, Puma. Во время реализации апоптотической программы представители разных групп семейства Bcl-2 функционируют как ионные каналы, стабилизируя или нейтрализуя барьерную функцию митохондриальной мембраны и соответственно ингибируя или стимулируя апоптотический каскад.

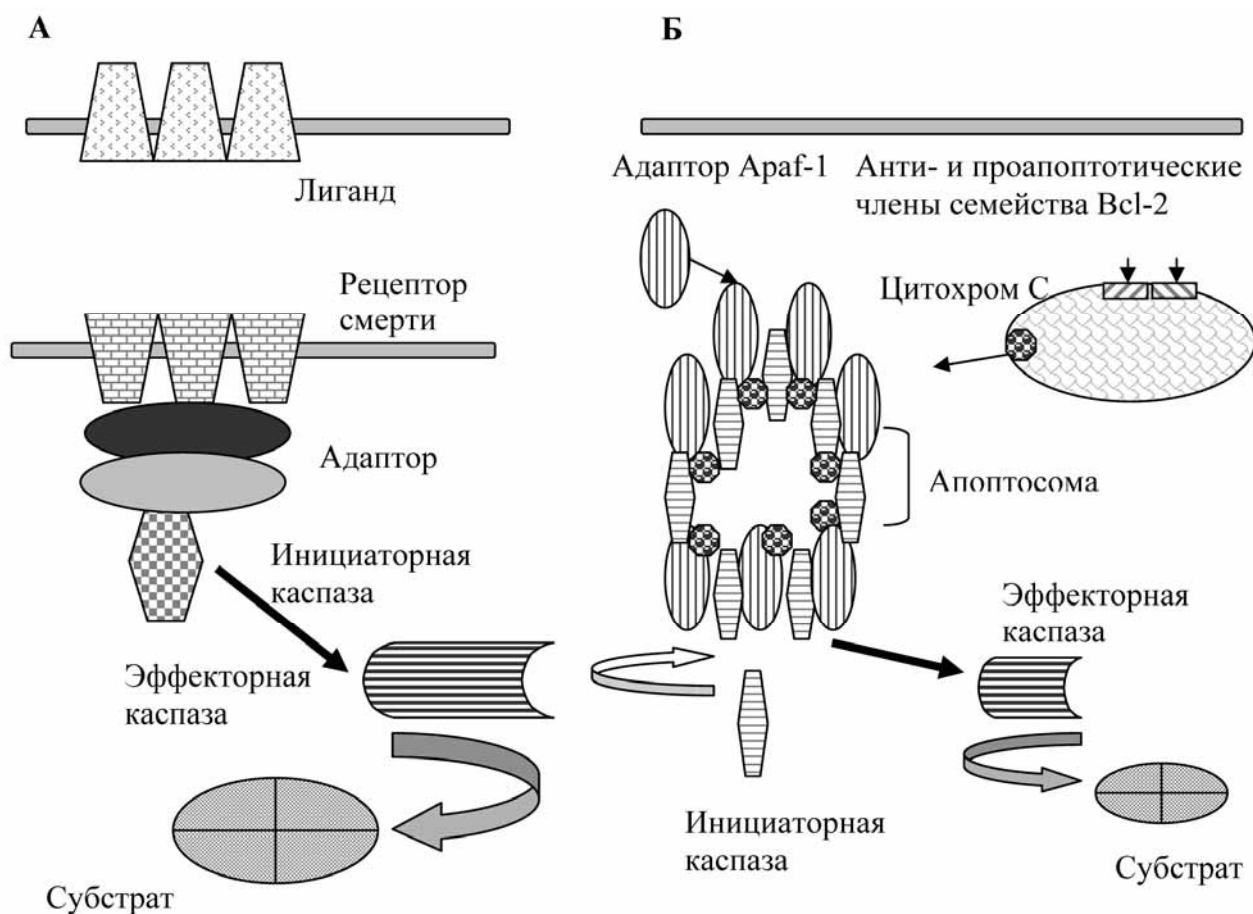


Рис. 1. Апоптотические пути в клетках млекопитающих:

А – внешний (рецептор-опосредованный) путь апоптоза. Взаимодействие рецепторов смерти и их лигандов приводит к олигомеризации рецептора, ассоциации адапторных молекул и активации инициаторных каспаз (каспазы-8,10). Впоследствии инициаторные каспазы протеолитически активируют эффекторные каспазы, которые вызывают деградацию клеточных субстратов.

Б – внутренний (митохондриальный) путь апоптоза. В реакциях на апоптотические стимулы действие Bcl-2 белков приводит к повышению проницаемости внешней митохондриальной мембраны и выход цитохрома С. В дальнейшем цитохром С связывает адапторный белок Араф-1, индуцируя его конформационные взаимодействия, необходимые для присоединения инициаторной прокаспазы-9. В результате формируется каспазо-активирующий комплекс (апоптосома), в составе которого активируется каспаза-9. Активная каспаза-9 инициирует активацию эффекторной каспазы-3, что способствует развитию апоптотической программы.

Другая группа белков, участвующих в реализации внешнего сигнального пути, включает рецепторы смерти и их природные лиганды [40; 41]. Рецепторы принадлежат суперсемейству рецепторов TNF, к которому относятся Fas-рецептор, TNF-рецептор (TNF-R1) и рецепторы для TNF-родственных апоптоз-индуцирующих лигандов (TRAIL). Они характеризуются наличием внутриклеточного домена смерти, который участвует в передаче апоптотического сигнала, взаимодействуя с внутриклеточными адапторными молекулами. Адапторные белки также содержат домен смерти (DD). Кроме того, в их состав входит каспазо-связывающий домен CARD, участвующий во взаимодействии с другими апоптотическими молекулами. С белками семейства рецепторов TNF (TNFR) взаимодействуют также белки, осуществляющие их связь с различными сигнальными путями клетки, включая NF-κB и JNK-сигнальные пути. Эти белки составляют семейство TNFR-ассоциированных факторов (TRAF).

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ И РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА

Регуляция апоптотической программы имеет многоуровневую структуру и осуществляется при участии множества факторов, действующих согласованно или в антагонизме по отношению друг к другу. Альтернативный сплайсинг является посттранскрипционным механизмом регуляции экспрессии генов и приводит к образованию различных изоформ белков [32; 39]. Баланс сигналов смерти/выживания напрямую зависит от регуляции альтернативного сплайсинга мРНК белковых факторов апоптоза.

В генах эукариот кодирующие последовательности (экзоны) перемежаются некодирующими последовательностями (интронами). В ядре клетки гены транскрибируются от начала до конца с образованием первичного РНК-транскрипта (пре-мРНК). В дальнейшем участки пре-мРНК, соответствующие интронам, вырезаются, а кодирующие участки соединяются в определенном порядке с образованием зрелой мРНК. Такой процесс назван сплайсингом. Сплайсинг осуществляется в особых структурах, называемых сплайсосомами. Они состоят из пре-мРНК, малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП) и целого комплекса вспомогательных белков. Функция сплайсосомы заключается в правильном вырезании интронов из первичного РНК-транскрипта [13].

Характерной чертой интронов является наличие специфических последовательностей вблизи их 5' и 3' концов (т.е. на стыках интронов и экзонов или в сайтах сплайсинга). Такие последовательности являются консервативными и участвуют в формировании и работе сплайсосомы [14]. Важную роль в сплайсинге пре-мРНК играет остаток аденозина вблизи 3' конца интрона (так называемая точка ветвления).

На 1-м этапе сплайсинга происходит расщепление фосфодиэфирной связи молекулы РНК в 5' сайте сплайсинга с образованием 2 продуктов: свободного 5'

экзона и лассоподобного интрона, связанного с 3' экзоном (рис. 2). На 2-м этапе осуществляется расщепление фосфодиэфирной связи РНК в 3' сайте сплайсинга. В дальнейшем происходит лигирование (сшивание) 2 экзонов и высвобождение интрона [17].

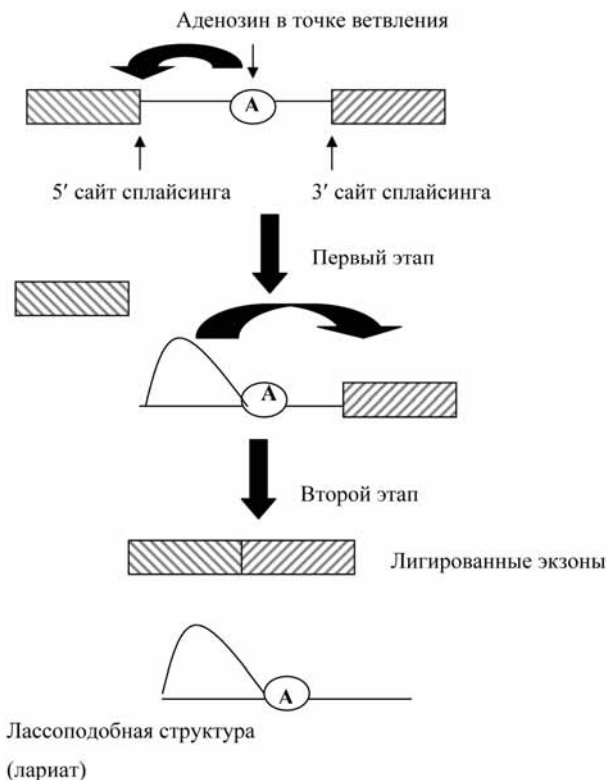


Рис. 2. Этапы реализации альтернативного сплайсинга:

Экзоны показаны как прямоугольники с разным типом штриховки, интроны представлены линиями. Стрелками указаны направления разрывов фосфодиэфирной связи в соответствующих сайтах сплайсинга. На 1-м этапе осуществляется разрыв фосфодиэфирной связи в 5' сайте сплайсинга с образованием свободного 5' экзона и лассоподобного интрона, связанного с 3' экзоном. Лассо содержит выполнивший переход аденозин, соединяющийся через обычные 5' и 3' связи, а также через 2'-5' связь с первым остатком интрона. На 2-м этапе осуществляется расщепление фосфодиэфирной связи РНК в 3' сайте сплайсинга. В дальнейшем происходит лигирование (сшивание) двух экзонов и высвобождение лассоподобного интрона.

В ряде случаев интроны имеют несколько сайтов сплайсинга, и тогда возможен альтернативный сплайсинг [32; 39]. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК является универсальным механизмом регуляции экспрессии генов и функционального разнообразия белковых продуктов. Альтернативному сплайсингу подвергаются многие первичные транскрипты [31]. Их кодирующие белок участки соединяются разными

способами, в результате образуются изоформы белков без изменения организации кодирующего гена.

Альтернативный сплайсинг контролируется специфическими факторами, экспрессия которых строго ограничена стадией развития или типом ткани организма [50]. Факторы могут действовать кооперативно или в антагонизме друг с другом.

РЕЦЕПТОРЫ СМЕРТИ И ИХ ЛИГАНДЫ

Как упоминалось ранее, внешний, рецептор-опосредованный путь апоптоза инициируется в результате взаимодействия рецепторов из семейства TNFR с соответствующими лигандами. Лиганды смерти обычно являются трансмембранными белками II типа (С-конец локализован экстраклеточно). Они обнаружены также в растворимой форме. Примером служит растворимый Fas-лиганд (FasL), который образуется в результате протеолитического шеддинга (схода с поверхности клетки) специфическими металлопротеиназами или за счет альтернативного сплайсинга мРНК [4; 23]. Растворимые изоформы характеризуются отсутствием трансмембранного, внутриклеточного и части внеклеточного доменов. Вне зависимости от механизма образования растворимый FasL проявляет антиапоптотическую активность.

Рецептор-опосредованная гибель клетки также регулируется путем образования различных изоформ рецептора. Так, мононуклеарные клетки периферической крови и некоторые опухолевые клетки экспрессируют мембранную и несколько растворимых изоформ Fas-антигена, образующихся в результате альтернативного сплайсинга мРНК [7; 33]. Мембранная форма участвует в передаче апоптотического сигнала внутрь клетки, тогда как альтернативные растворимые формы модулируют его передачу. Механизмы действия растворимых изоформ Fas-антигена могут варьировать. Это обусловлено разной структурой растворимых белковых молекул [8; 11]. Мономерная форма растворимого Fas-антигена ингибирует апоптоз, тогда как ее олигомерная форма участвует в инициации апоптотического сигнала [34].

Результаты собственных исследований свидетельствуют о том, что при раке молочной железы обнаружено исчезновение присутствующих в норме отдельных вариантов мРНК Fas-антигена, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Продemonстрировано, что опухолевый процесс, а также проводимая химиотерапия и лучевая терапия приводили к исчезновению минорных вариантов мРНК растворимого Fas-антигена с сохранением доминирующей формы этого антигена. Обнаруженные изменения транскриптома сопровождались нарушением сывороточной концентрации мономерной формы растворимого Fas-антигена при неизменной концентрации олигомерной формы этого белка [1].

Другим представителем рецепторов смерти является лимфоцит-ассоциированный рецептор смерти (LARD), вызывающий апоптоз Т-лимфоцитов [42]. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК *LARD* приво-

дит к образованию 11 изоформ, представленных мембранной и растворимыми молекулами. Продукция изоформ *LARD* находится под контролем альтернативного сплайсинга и изменяется во время активации Т-клеток.

Альтернативный сплайсинг мРНК рецепторов смерти участвует в модуляции гомеостаза опухолевых клеток. Так, при кожной Т-клеточной лимфоме в опухолевых клетках экспрессируется альтернативная форма Fas антигена, образующаяся в результате неполного сплайсинга интрона 5. Эта изоформа характеризуется отсутствием трансмембранного домена, домена смерти и свойственна этой лимфоме [12].

ИНГИБИТОРЫ АПОПТОЗА

Ингибиторами апоптоза являются IAP-белки [2; 36]. Все IAP-белки на N-конце содержат от 1 до 3 специфических повторов, называемых BIRs (примерно по 70 аминокислот в каждом). Одним из представителей семейства IAP-белков является белок сурвивин (*survivin*), участвующий в ингибировании каспаз. Его экспрессия значительно повышается в опухолевых клетках. Обнаружено несколько изоформ сурвивина, образующихся в результате альтернативного сплайсинга [5]. Некоторые из них способны вызывать гетеродимеры, обладающие антиапоптотическим потенциалом. Уровень экспрессии изоформ сурвивина коррелирует с прогрессией опухолей. Например, повышение экспрессии ΔEx3 изоформы сурвивина происходит при прогрессировании гепатоцеллюлярной карциномы [45]. Вторичные митохондриальные активаторы каспаз (*Smac*-белки) связывают IAP-белки (ингибиторы каспаз), элиминируя их негативный по отношению к каспазам эффект [16]. Следует отметить, что альтернативный сплайсинг характерен и для этой группы белков, вызывая образование изоформ, обладающих проапоптотическим потенциалом.

Среди значительного количества белков, ингибирующих апоптоз, известны протеины, замедляющие активацию прокаспазы-8. Они получили название FLICE-ингибирующие белки (*c-FLIP*) [2; 36]. Основной их характеристикой является наличие 2 N-концевых DED-доменов (доменов связывания эффекторов смерти) и отсутствие DD-домена (домена смерти). Это позволяет им присоединяться к FADD (Fas-ассоциированный домен смерти) или каспазе-8 и препятствовать формированию DISC (смерть-индуцирующий сигнальный комплекс). В настоящее время обнаружено большое количество изоформ мРНК *c-FLIP*, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Однако на белковом уровне идентифицированы только 3 варианта: *c-FLIP_S*, *c-FLIP_R*, *c-FLIP_L* [19]. Несмотря на общеизвестный факт антиапоптотической направленности *c-FLIP*, их роль во время апоптоза противоречива. Так, *c-FLIP_L* способен активировать каспазу-8, а *c-FLIP_S* обладает антиапоптотической активностью. Таким образом, экспрессия тех или иных изоформ *c-FLIP*-белков может приводить к различным эффектам и влиять на апоптотические процессы.

КАСПАЗЫ И ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Представители семейства каспаз конститутивно присутствуют в клетках, что позволяет быстро индуцировать апоптоз. В рамках реализации апоптотической программы каспазы выполняют многочисленные функции, активируя сигнальные белки или вызывая их деградацию. При этом разные варианты каспаз, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, часто выполняют антагонистические функции [22]. Например, альтернативные изоформы каспазы-8 могут разнонаправленно регулировать апоптоз, обеспечивая передачу апоптотического сигнала или снижая чувствительность клеток к Fas-опосредованному апоптозу [21; 24].

Хорошо известно, что белок p53 является онко-супрессором, препятствующим злокачественному изменению клеток [6]. Он задерживает клетку в фазе перехода G₁/S. Выступая в качестве транскрипционного фактора, p53 активирует экспрессию генов систем репарации ДНК. Если репарационным системам не удастся ликвидировать возникающих в опухолевых клетках повреждений ДНК, то осуществляется индукция апоптоза. Альтернативный вариант p53 (p47), образующийся в результате делеции N-концевого участка белка, вызывает супрессию транскрипционной активности p53 дикого типа и ингибирует ростовой потенциал опухоли [18]. Таким образом, исследование экспрессии изоформ p53 открывает важные аспекты механизмов опухолевого роста.

ЧЛЕНЫ СЕМЕЙСТВА BCL-2 И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ЛИГАНДЫ

Наиболее многочисленная группа регуляторов апоптоза представлена семейством Bcl-2. Ряд белков этого семейства синтезируются с участием альтернативного сплайсинга мРНК с образованием различных изоформ. Смещение баланса между изоформами приводит к модуляции апоптотического потенциала клетки и вносит вклад в развитие опухолевого процесса.

Одним из представителей семейства является белок Bcl-x. Регуляция его экспрессии включает возможность альтернативного сплайсинга пре-мРНК, приводящего к образованию 2 белковых изоформ Bcl-x (рис. 3). Так использование вышележащего (upstream) 5' сайта сплайсинга (5'cc) в экзоне 2 приводит к образованию проапоптотического варианта молекулы (Bcl-xS), тогда как использование нижележащего (downstream) 5' сайта сплайсинга способствует образованию антиапоптотического варианта (Bcl-xL). «Длинная» форма (Bcl-xL) содержит 4 ВН домена и проявляет антиапоптотические свойства. «Короткая» форма (Bcl-xS) не содержит ВН1 и ВН2 доменов и участвует в реализации апоптоза [40]. Оба варианта требуются для нормального функционирования клетки. Вместе с тем их экспрессия отличается в разных типах клеток и тканей. Так, в опухолевых клетках преобладает экспрессия Bcl-xL, тогда как в тимусе и селезенке – Bcl-xS. Соотношение экспрессии изоформ

Bcl-x находит отражение в регуляции апоптотической программы. Например, при раке молочной железы наблюдается повышение экспрессии Bcl-xL, что является возможной причиной развития метастазов [29].

Наиболее уникальным представителем семейства Bcl-2 является белок Bid, содержащий только домен ВН3, участвующий в интеграции внешнего (опосредованного рецепторами смерти) и внутреннего (митохондриального) сигнальных путей. После стимуляции соответствующих рецепторов смерти активированная каспаза-8 расщепляет Bid с образованием усеченной формы (tBid), взаимодействующей с факторами митохондриального пути передачи апоптотического сигнала. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию нескольких изоформ Bid, отличающихся по экспрессии, клеточной локализации и апоптотической активности [38]. Эти изоформы участвуют в регуляции работы tBid, а их экспрессия изменяется в ответ на разные апоптотические сигналы.

Одним из белков, участвующих в модуляции апоптотической программы, является внутриклеточный лиганд для CD27 антигена Siva, экспрессирующийся в лимфоидных клетках [35]. Его экспрессия инициирует активацию каспаз и требует участия митохондрий. Этот лиганд существует в виде 2 альтернативных изоформ (Siva-1 и Siva-2), проявляющих апоптотическую активность. Важной особенностью полноразмерной молекулы Siva-1 является наличие домена смерти в центральной части молекулы. У белка Siva-2 такой домен отсутствует. При этом обе изоформы сохраняют способность индуцировать апоптоз. Показана возможность Siva-1 взаимодействовать с Bcl-xL и нейтрализовать антиапоптотический эффект последнего.

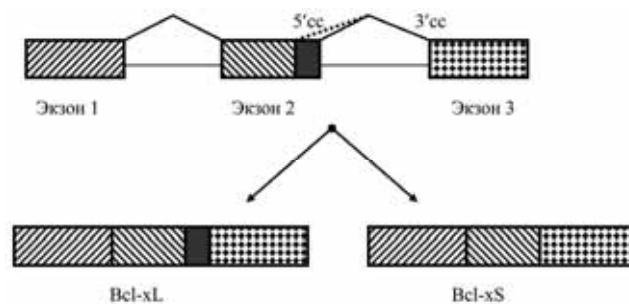


Рис. 3. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК Bcl-x:

Использование альтернативных 5'сайтов сплайсинга экзона 2 приводит к образованию двух изоформ, проявляющих разные функциональные свойства. Так использование вышележащего (upstream) 5' сайта сплайсинга (5'cc) в экзоне 2 приводит к образованию «короткого» варианта молекулы (Bcl-xS), характеризующегося отсутствием ВН1 и ВН2 доменов, проявляющего проапоптотические свойства. Использование нижележащего (downstream) 5' сайта сплайсинга способствует образованию «длинной» формы (Bcl-xL), содержащей 4 ВН домена и проявляющей антиапоптотические свойства.

РЕГУЛЯЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА ВО ВРЕМЯ АПОПТОЗА

В осуществлении и регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК принимает участие множество белков. Совокупность регуляторных белковых факторов, сложным образом взаимодействующих друг с другом, обуславливает выбор сшиваемых в процессе сплайсинга экзонов. Концентрация и активность регуляторных белков варьирует в зависимости от типа ткани и клетки и меняется при нарушении гомеостатического равновесия, в том числе при онкопатологии [43; 44]. Нарушение механизма альтернативного сплайсинга в опухолевых клетках характеризуется синтезом множества минорных форм мРНК, неполным сплайсингом (сохранение интрона в составе транскрипта), появлением антисмысловых РНК, образованием нефункциональных белков [25; 26].

Факторами, регулируемыми сплайсинг пре-мРНК, являются SR-белки и их антагонисты hnRNP [11; 43]. SR-белки имеют 1 или 2 РНК-связывающих домена и RS-домен, содержащий в своем составе аминокислотные повторы аргинина и серина. Обратимое фосфорилирование сериновых остатков регулирует функциональную активность SR-белков [20]. Недавние исследования показали, что церамид индуцирует дефосфорилирование SR-белков, которое вызывает альтернативный сплайсинг мРНК *Bcl-x* и каспазы-9. Кроме того, этопозид-индуцированный альтернативный сплайсинг каспазы-2 также происходит в результате синтеза эндогенного церамида [3]. Подобная взаимосвязь событий сплайсинга и сигнальных путей образования церамида обеспечивает дополнительную регуляцию апоптоза.

SR-белки подвергаются посттрансляционным модификациям во время апоптоза, что выражается в снижении уровня фосфорилирования этих белков. В опухолевых клетках связывание FasL приводит к активации SR-протеинкиназы-1 (SRPK1), которая фосфорилирует SR-белки [48]. Церамид действует как вторичный мессенджер, который регулирует клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, активируя разнообразные сигнальные каскады. Некоторые внеклеточные стимулы инициируют активацию кислых сфингомиелиназ и вызывают образование церамида *de novo*. Эндогенный церамид модулирует уровень фосфорилирования SR-белков и регулирует альтернативный сплайсинг *Bcl-x* и каспазы-2 и 9, Fas-антигена и ряда других эффекторов апоптоза [3; 10].

Белок TIA-1, участвующий в реализации апоптотической программы, также регулирует альтернативный сплайсинг мРНК проапоптотических белков, способствуя образованию сплайсосом [15]. При этом изменение экспрессии TIA-1 оказывает влияние на выбор конкретного сайта сплайсинга. В результате TIA-1 обеспечивает накопление транскриптов, кодирующих проапоптотические белки, и предотвращает образование белков, проявляющих антиапоптотический эффект. Известны другие примеры регуляции сплайсин-

га мРНК, кодирующих белки, участвующие в апоптотических процессах. TIA-1-родственный фактор (TIAR) регулирует альтернативный сплайсинг Fas-антигена, контролируя образование мембранной формы рецептора [46]. Взаимодействие Fas/FasL приводит к активации серин/треониновой киназы FAST, которая вызывает фосфорилирование TIA-1, изменяя его активность как регулятора сплайсинга пре-мРНК Fas-антигена [3; 47].

Заметим, что FAST локализуется на внешней митохондриальной мембране, взаимодействует с Bcl-xL, модулируя активность последнего [27; 28]. Кроме того, FAST повышает экспрессию эндогенных ингибиторов апоптоза. Предполагается, что FAST нейтрализует негативный эффект TIA-1, направленный на снижение транскрипции мРНК, кодирующих ингибиторы апоптоза. Таким образом, FAST функционирует в качестве репрессора апоптотической программы гибели клеток. В свою очередь, TIA-1 ингибирует этот эффект. В соответствии с этой моделью FAST и TIA-1 являются функциональными антагонистами, которые взаимодействуют друг с другом, определяя уровень экспрессии белка и восприимчивость клеток к апоптозу.

Регуляторной системой более высокого порядка являются антисмысловые транскрипты. Механизм действия антисмысловых транскриптов включает образование двуцепочечных РНК, участвующих в посттранскрипционной регуляции гена [25]. Такие двуцепочечные РНК вызывают посттранскрипционное снижение экспрессии гена. Этот процесс включает образование малых интерферирующих РНК (siRNA) из двуцепочечных РНК-предшественников с помощью рибонуклеазы III [30].

Обнаружено, что недавно идентифицированный антисмысловой транскрипт *Saf*, принадлежащий к категории длинных некодирующих РНК, участвует в регуляции экспрессии Fas-антигена на посттранскрипционном уровне. *Saf* повышает экспрессию растворимых молекул Fas и не влияет на образование мембранных форм. *Saf* модулирует сплайсинг пре-мРНК Fas-антигена, изменяя соотношение транскриптов, кодирующих растворимые и мембраносвязанные молекулы, и ингибирует Fas-опосредованный апоптоз. Его экспрессия наблюдается в разных типах клеток, включая различные линии опухолевых клеток [49]. Предполагается, что эндогенный антисмысловой транскрипт *Saf* регулирует экспрессию альтернативных изоформ Fas-антигена на уровне сплайсинга пре-мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, множественные события, происходящие на уровне регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК, способны воздействовать на апоптотические процессы в клетке, что необходимо учитывать при создании новых биотерапевтических препаратов. Изучение механизмов регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК, кодирующей апоптотические факторы, позволит создать подходы к направ-

ленному изменению соотношения изоформ апоптотических белков. Кроме того, соотношение белковых изоформ может выступать в качестве одного из мониторинговых показателей развития опухолевого процесса и эффективности проводимой терапии [37].

ЛИТЕРАТУРА

1. Новиков В.В., Алясова А.В., Уткин О.В. и др. Растворимые антигены CD38 и CD95 при раке молочной железы // РБЖ. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 46–51.
2. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // РБЖ. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 5–11.
3. Aratake K., Kamachi M., Iwanaga N. et al. A cross-talk between RNA splicing and signaling pathway alters Fas gene expression at post-transcriptional level: Alternative splicing of Fas mRNA in the leukemic U937 cells // J. Lab. Clin. Med. – 2005. – Vol. 146, №3. – P. 184–91.
4. Ayroldi E., D'Adamio F., Zollo O. et al. Cloning and expression of a short Fas ligand: a new alternatively spliced product of the mouse Fas ligand gene // Blood. – 1999. – Vol. 94. – P. 3456–67.
5. Caldas H., Jiang Y., Holloway M.P. et al. Survivin splice variants regulate the balance between the proliferation and cell death // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – P. 1994–2007.
6. Carson D.A. Cancer progression and p53 // Lancet. – 1995. – Vol. 346. – P. 1009–11.
7. Cascino I., Fiucci G., Papoff G., Ruberti G. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing // J. Immunol. – 1995. – Vol. 154. – P. 2706–13.
8. Cascino I., Papoff G., De Maria R. et al. Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis // J. Immunol. – 1996. – Vol. 156. – P. 13–7.
9. Chang H. I., Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases // Microbiol. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 64, № 4. – P. 821–46.
10. Chalfant C., Rathman K., Pinkerman R.L. et al. De novo ceramide regulates the alternative splicing caspase-9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, № 15. – P. 12587–95.
11. Cheng J., Liu C., Koopman W.J., Mountz J.D. Characterization of human Fas gene // J. immunol. – 1995. – Vol. 154. – P. 1239–45.
12. Doorn R., Dijkman R., Vermeer M.H. et al. A novel splice variant of the Fas gene in patients with cutaneous T-cell lymphoma // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62. – P. 5389–92.
13. Dreyfuss G., Hentze M., Lamond A. I. From transcript to protein // Cell. – 1996. – Vol. 85. – P. 963–72.
14. Farrer T., Roller A.B., Kent W.J., Zahler A.M. Analysis of the role of Caenorhabditis elegans GC-AG introns in regulated splicing // Nucl. Acids. Res. – 2002. – Vol. 30, № 15. – P. 3360–7.
15. Forch P., Puig O., Kedersha N. et al. The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing // Mol. Cell. – 2000. – Vol. 6. – P. 1089–98.
16. Fu J., Jin Y., Arend L.J. Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 52660–72.
17. Garcia-Blanco M.A. Messenger RNA reprogramming by spliceosome-mediated RNA trans-splicing // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 112. – P. 474–80.
18. Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing // Mol. Cell Biol. – 2004. – Vol. 24, № 18. – P. 7987–97.
19. Golks A., Brenner D., Fritsch C. et al. c-FLIP_R, a new regulator of death receptor-induced apoptosis // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280, № 15. – P. 14507–13.
20. Graveley B.R. Sorting out the complexity of SR protein functions // RNA. – 2000. – Vol. 6. – P. 1197–211.
21. Himeji D., Horiuchi T., Tsukamoto H. et al. Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade // Blood. – 2002. – Vol. 99, № 11. – P. 4070–8.
22. Ho P., Hawkins J. Mammalian initiator apoptotic caspases // FEBS J. – 2005. – Vol. 272. – P. 5436–53.
23. Kayagaki N., Kawasaki A., Ebata T. et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand // J. Exp. Med. – 1995. – Vol. 182. – P. 1777–83.
24. Kisenge R.R., Toyoda H., Kang J. et al. Expression of short-form caspase 8 correlates with decreased sensitivity to Fas-mediated apoptosis in neuroblastoma cells // Cancer Sci. – 2003. – Vol. 94, № 7. – P. 598–605.
25. Kumar M., Carmichael G.G. Antisense RNA: Function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes // Microbiol. And Mol. Biol. – 1998. – Vol. 62, №4. – P. 1415–34.
26. Lewis B.P., Green R.E., Brenner S.E. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated RNA decay in humans // Genetics. – 2003. – Vol. 100, № 1. – P. 189–92.
27. Li W., Kedersha N., Chen S. et al. FAST is Bcl-xL-associated mitochondrial protein // BBRC J. – 2004. – Vol. 318. – P. 95–102.
28. Li W., Simarro M., Kedersha N., Anderson P. FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression // Mol. Cell Biol. – 2004. – Vol. 24, № 24. – P. 10718–32.
29. Mercatante D.R., Mohler J.L., Kole R. Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, № 51. – P. 49374–82.
30. Milhavet O., Gary D.S., Mattson M.P. RNA interference in biology and medicine // Pharmacology. – 2003. – Vol. 55, № 3. – C. 629–48.
31. Mironov A., Fickett J.W., Gelfand M.S. Frequent alternative splicing of human genes // Gen. Res. – 1999. – Vol. 9. – P. 1288–93.

32. Modrek B., Lee C. A genomic view of alternative splicing // *Nature genetics*. – 2002. – Vol. 30. – P. 13–9.
33. Papoff G., Cascino I., Eramo A. *et al.* An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 156. – P. 4622–30.
34. Proussakova O.V., Rabaya N.A., Moshnikova A.B. *et al.* Oligomerization of Soluble Fas Antigen Induces Its Cytotoxicity // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278, № 38. – P. 36236–41.
35. Py B., Slomianny C., Auberger P. *et al.* Siva-1 and Siva-2 an alternative splice form lacking the death domain, Siva-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspase-dependent mitochondrial pathway // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 4008–17.
36. Reed J.C., Doctor K.S., Goldzik A. The domain of apoptosis: a genomic perspective // *Sci. STKE*. – 2004. – Vol. 239. – P. 1–29.
37. Reed J.C., Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – P. 408–18.
38. Renshaw S.A., Dempsey C.E., Barnes F.A. *et al.* Three novel Bid proteins generated by alternative splicing of the human Bid gene // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 4. – P. 2846–55.
39. Roberts G.C., Smith C. Alternative splicing: combinatorial output from the genome // *Chem. Biol.* – 2002. – Vol. 6. – P. 375–83.
40. Schwerk C., Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing // *Mol. Cell.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1–13.
41. Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M. *et al.* Apoptosis signaling by death receptors // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 254. – P. 439–59.
42. Screaton G.R., Xu X., Olsen A.L. *et al.* LARD: A new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 94. – P. 4615–9.
43. Stamm S. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome // *Human Mol. Genetics*. – 2002. – Vol. 11, № 20. – P. 2409–16.
44. Stamm S., Ben-Ari S., Rafalska I. *et al.* Function of alternative splicing // *Gene*. – 2005. – Vol. 344. – P. 1–20.
45. Takashima H., Nakajima T., Moriguchi M. *et al.* In vivo expression patterns of survivin and its splicing variants in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma // *Liver Intern.* – 2005. – Vol. 25. – P. 77–84.
46. Taupin J., Tian Q., Kedersha N. *et al.* The RNA-binding protein TIAR is translocated from the nucleus to the cytoplasm during Fas-mediated apoptotic cell death // *Cell Biol.* – 1995. – Vol. 92. – P. 1629–33.
47. Tian Q., Taupin J., Elledge S. *et al.* Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 182. P – 865–74.
48. Utz P.J., Hottelet M., van Venrooij W.J., Anderson P. Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187. – P. 547–60.
49. Yan M., Hong C., Lai G. *et al.* Identification and characterization of a novel gene Saf transcribed from the opposite strand of Fas // *human Mol. Genetics*. – 2005. – Vol. 14, № 11. – P. 1465–74.
50. Yeo G., Holste D., Kreiman G., Burge C.B. Variation in alternative splicing across human tissues // *Gen. Biol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 15.

Поступила 22.05.2006.

УДК 616-006.446.8-092.4:616-097:576.5

N.I. Grineva¹, A.Yu. Baryshnikov², L.P. Gerasimova¹, T.V. Borovkova¹,
G.P. Sarkisyan¹, T.E. Manakova¹, T.V. Akhynina¹, N.P. Logacheva², N.M. Naydenova¹

ANTIGENE EXPRESSION KINETICS FOR HUMAN CML PH⁺ CELLS UNDER CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION IN THE SUSPENSION CULTURE

¹Research Center for Hematology RAMS, Moscow

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

Expression kinetics of 8 antigens (CD34, CD33, CD15, CD13, CD11b, CD14, CD3, CD19) under cultivation of Ph⁺, BCR/ABL⁺ cells that are resulted in chromosome translocation t(9,22) and determined CML arising and progression have been studied in comparison with cell differentiation kinetics tested by cell morphology. Under 14 days cultivation in vitro of Ph⁺, BCR/ABL⁺ mononuclears from peripheral blood of CML patient with b3a2 BCR/ABL mRNA there are identified additionally to cell differentiation according to CML myelopoiesis scheme also the active CD34 antigen expression on granulocytes and lymphocytes precursors. Active CD34⁺ cell accumulation occurs at cultivation finish under significant decrease of Ph⁺ mononuclear concentration due to differentiation and apoptosis. Expression kinetics of CD34 antigen and other antigens look like two-phases pattern with noticeable activation of antigen expression close to cultivation finishing. There is strong correlation between CD34 antigen expression and cell proliferation in the first cultivation phase and especially in the second phase proliferation (7-14 days). CD34⁺ cell proliferation that are mainly presented by CD34⁺ myeloid precursor cells is assumed to be resulted in exit of G₀/G₁ phases of cell cycle with consequent partial differentiation in the cytokine presence and conservation in G₀ without cytokines. Simultaneous CD34 antigen expression on blast cells (myeloid and lymphocyte precursors) in the Ph⁺ mononuclears studied shows that chromosome translocation t(9,22) resulted in early cell precursors of this CML patient – that look like is an polipotent hematopoietic stem cells or hematopoietic stem cell itself.

Key words: hematopoietic Ph⁺ BCR/ABL⁺ cells in culture, kinetics of Ph⁺ cells proliferation, differentiation and proliferation, chronic myeloid leukemia, antigens expression, CD34, CD33, CD15, CD13, CD11b, CD14, CD3, CD19.

Н.И. Гринева¹, А.Ю. Барышников², Л.П. Герасимова¹, Т.В. Боровкова¹,
Г.П. Саркисян¹, Т.Е. Манакова¹, Т.В. Ахлынина¹, Н.П. Логачева², Н.М. Найденкова¹

КИНЕТИКА ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ В ПРОЦЕССЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ PH⁺-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ В КУЛЬТУРЕ

¹Гематологический научный центр РАМН, Москва

²ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Изучена кинетика экспрессии 8 антигенов (CD34, CD33, CD15, CD13, CD11b, CD14, CD3 и CD19) при культивировании Ph⁺ BCR/ABL⁺-клеток, образующихся при хромосомной транслокации t(9,22) и определяющих развитие хронического миелолейкоза в сравнении с кинетикой дифференцировки, тестируемой по морфологии клеток. При 14-сут культивировании *in vitro* Ph⁺ BCR/ABL⁺-моноклеаров из периферической крови больного ХМЛ с мРНК b3a2 BCR/ABL, кроме дифференцировки клеток по схеме, характерной для миелопоэза при ХМЛ, идентифицирована также длительная пролиферация CD34⁺-предшественников миелоидных клеток и лимфоцитов. Активное накопление CD34⁺-клеток происходит в конце культивирования при значительном уменьшении концентрации Ph⁺-моноклеаров при дифференцировке и апоптозе и объясняет повторную активацию пролиферации и рост отношения P/D – делящихся и неделящихся клеток – в конце культивирования. Кинетика экспрессии CD34 антигена и других исследованных антигенов имеет двухфазный характер с существенной активацией экспрессии антигенов к концу культивирования, что указывает на дифференцировку CD34⁺-клеток в 1-й фазе и активацию пролиферации CD34⁺-клеток во 2-й фазе (7–14 сут).

В этой фазе пролиферация CD34⁺-клеток, состоящих преимущественно из CD34⁺-предшественников миелоидных клеток (вероятно, КОЕ-ГМ и более ранних), происходит, как предполагается, в результате выхода CD34⁺-клеток в G₁ из G₀ фазы клеточного цикла с последующей, вероятно, частичной, дифференцировкой в присутствии цитокинов и консервацией в G₀ без них. Одновременная экспрессия антигенов CD34 на предшественниках гранулоцитов и на лимфоцитах в исследованных Ph⁺-клетках указывает на хромосомную транслокацию t(9,22) у данного больного ХМЛ в раннем предшественнике – в полипотентной стволовой клетке или даже ранее.

Ключевые слова: гемопоэтические Ph⁺ BCR/ABL⁺-клетки в культуре *in vitro*, кинетика пролиферации и дифференцировки, бласты, лейкозные стволовые клетки, хронический миелолейкоз, экспрессия антигенов CD34, CD33, CD15, CD13, CD11b, CD14, CD3 и CD19.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям о механизмах возникновения и прогрессии лейкозов злокачественный этап болезни формируется в результате образования и функционирования лейкозных стволовых клеток (ЛСК). Образование этих клеток может протекать при хромосомных транслокациях, последующих мутациях и/или специфических изменениях генной регуляции [21; 23; 25; 30].

В зависимости от вида хромосомной транслокации клон ЛСК начинает формироваться либо сразу из стволовой гемопоэтической клетки (СКК), либо поэтапно. Вначале возникают трансформированные клетки, сохраняющие способность к мультипотентному кроветворению, которые затем мутируют в ЛСК [29; 30]. Этот путь реализуется при развитии хронического миелолейкоза (ХМЛ) от хронической фазы (ХФ) до бластного криза. ХФ ХМЛ возникает при реципрокной хромосомной транслокации t(9,22) в стволовых гемопоэтических клетках (СКК) с образованием Ph⁺BCR/ABL⁺-клеток, способных к дифференцировке (D-Ph⁺-клетки). Согласно [21; 23; 25; 29; 30] D-Ph⁺-клетки могут превращаться в клон ЛСК вследствие мутаций не только в стволовых клетках, но и в их специализированных потомках: полипотентных, коммитированных предшественниках и даже в созревающих клетках [23]. При этом ЛСК подобно СКК способны к длительному самоподдержанию (посредством сохранения значительной доли клеток в G₀ фазе клеточного цикла), но не способны к дифференцировке.

Особенности Ph⁺-клеток при ХМЛ определяет онкоген BCR/ABL, образовавшийся в составе Ph⁺-хромосомы в результате хромосомной транслокации, и его продукт – онкобелок – активная тирозинкиназа p210. Онкобелок p210 фосфорилирует различные факторы транскрипции и СТАТ белки (белки сигнальной трансдукции и активаторы транскрипции) и, активируя транскрипцию целого ряда генов, изменяет многие пути сигнальной трансдукции и в итоге – генную регуляцию клеток [15; 19; 20; 23; 27; 29–32]. Многообразие действия p210 создает особые сложности в исследовании накопления мутаций в D-Ph⁺-клетках при их превращении в ЛСК. В настоящее время не известно, как и какие клетки-предшественники или их потомки и на каком этапе развития ХМЛ превращаются в ЛСК.

Сложные механизмы кроветворения, включающие пролиферацию, многоэтапную дифференцировку с делением клеток, созреванием клеток без деления и апоптозом зрелых клеток и/или его блокированием затрудняют исследования последовательности процессов в прогрессии ХМЛ.

Весьма успешные современные исследования генной регуляции обсуждаемых процессов проведены методами трансфекции клеточных линий, культур стволовых клеток мышей и на потомках этих клеток, генетическими конструкциями, экспрессирующими заданные белки. С помощью таких подходов выявлены многочисленные гены, участвующие в регуляции СКК [21; 23; 25; 29; 30]. Последовательность процессов в клетках-предшественниках исследуется в культурах, получаемых из одной-единственной полипотентной клетки. Такие подходы однако не позволяют исследовать последовательность процессов, участвующих в превращениях D-Ph⁺-клеток в ЛСК, например, при лейкозах из-за отсутствия адекватных клеточных моделей.

Ранее мы исследовали кинетику пролиферации, дифференцировки, апоптоза и транскрипции антиапоптотических генов в культурах Ph⁺-клеток при ХМЛ и убедились в информативности изучения непрерывной регуляции клеточных и молекулярных процессов при ХМЛ *in vitro* [2]. Такой путь позволяет в динамике судить о состоянии кроветворения на разных этапах болезни.

В данной работе с целью выявить лейкозный злокачественный клон на ранних этапах ХМЛ мы исследовали кинетику экспрессии 8 антигенов на Ph⁺-клетках ПК больного в хронической фазе ХМЛ при 14-сут культивировании в суспензионной культуре до начала лечения в сравнении с кинетикой дифференцировки этих клеток. В итоге кроме дифференцировки по схеме, характерной для миелопоэза при ХМЛ, идентифицирована также пролиферация CD34⁺-клеток и ее некоторые особенности, что позволяет подойти к идентификации этих клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные материалы: гепарин (Flow, Англия); Limphoprep, среда альфа-MEM (MP Biomedical, США); DEPC, Hepes, Трис, PBS, эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), цитрат Na, лаурилсаркозил

(ICN, США); краситель трипановый синий, L-глутамин и 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия), пенициллин и стрептомицин (ОАО «Биохимик», Саранск, Россия); Г-КСФ (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Франция); моноклональные антитела (МАТ) соответственно: ICO-115, ICO-174, ICO-175, ICO-GM1, ICO-90, F(ab')₂ фрагмент FITC-меченной кроличьей сыворотки против иммуноглобулинов мыши (НПО «Медбиоспектр», Москва). Фикоэритрин-меченные МАТ (PE-CD33, PE-CD13 и PE-CD19, Caltag, США).

Ph⁺BCR/ABL⁺-клетки получали из ПК от больного ХМЛ в хронической фазе до лечения (ГНЦ РАМН, где в клетках ПК данного больного была идентифицирована Ph⁺-хромосома в 94 % митозов) и помещали во флакон с гепарином (50 ед/мл). Из ПК выделяли фракцию моноклеаров в градиенте плотности фикола 1,077 г/см³ (Lymphoprep, MP Biomedica). В Ph⁺-моноклеарах методом RT-PCR определяли транскрипт мРНК BCR/ABL b3a2 типа (длина амплификата 378 пар оснований) [7].

Ph⁺BCR/ABL⁺-моноклеары культивировали в среде α-MEM (MP Biomedica), содержащей 20 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (ICN), 2mM L-глутамина (Serva), 10⁻⁴ моль/л 2-меркаптоэтанол (Serva), 100 ед. пенициллина и 50 ед. стрептомицина, 25 mM Непес (pH 7,2–7,4), обозначая условиями культивирования без факторов роста. Для культивирования с факторами к той же среде добавляли 100 нг/мл Г-КСФ (F.Hoffmann-La Roche Ltd) и интерлейкин-3 (ИЛ-3) в составе кондиционированной среды (10 % по объему), которую получали от клеточной линии U5637 по [28]. Ph⁺-клетки (1,1×10⁶ клеток в 1 мл) инкубировали в 24 ячеечных платах по 12 ячеек на каждую пробу в течение 14 дней при 37 °C в условиях абсолютной влажности и 5 % содержания CO₂. В пробах, отбираемых в процессе культивирования, определяли число живых и мертвых клеток, анализировали экспрессию поверхностных антигенов и морфологию клеток в мазках по Романовскому [1; 3; 10; 34].

Кинетические кривые дифференцировки гранулоцитов и лимфоцитов определяли по изменению состава морфологически идентифицируемых клеток в мазках по методу Романовского [1]. Концентрацию различающихся по морфологии клеток высчитали из общей концентрации моноклеаров на кривой их роста и %-ного состава клеток на мазках. Концентрацию выражали в 10⁶ клеток на мл суспензионной культуры.

Кинетику изменений индекса P/D гранулоцитов определяли как отношение концентраций суммы пролиферирующих клеток (бласты, промиелоциты, миелоциты) к сумме дифференцирующихся без деления и зрелых гранулоцитов (метамиелоциты, палочкоядерные, сегментоядерные нейтрофилы) по [2; 6].

Для анализа экспрессии антигенов CD34, CD14, CD15, CD11b, CD3 использовали моноклональные антитела (МКА) соответственно: ICO-115, ICO-174, ICO-175, ICO-GM1, ICO-9, и F(ab')₂ фрагмент FITC-меченной кроличьей сыворотки против иммуноглобулинов мыши (НПО «Медбиоспектр», Москва) в мето-

де непрямого иммунофенотипирования с помощью FASCan-анализа [3; 10; 34]. Для этого 5×10⁵ клеток инкубировали 30 мин с 20 мкл МКА при 4 °C, дважды промывали PBS и затем инкубировали 30 мин с 20 мкл FITC-меченной сыворотки кролик – мышь при 4 °C. Клетки дважды промывали PBS, и экспрессию поверхностных клеточных антигенов определяли цитофлюориметрически в гранулоцитарном и лимфоцитарном гейтах на приборе FASCan, Beckton Dickinson по светорассеянию и размерам клеток, результаты оценивали в процентах. В отдельных случаях клетки до анализа ресуспендировали в 1%-ном растворе формальдегида в PBS [10; 34].

Для анализа антигенов CD33, CD19 и CD13 использовали метод прямого иммунофенотипирования с помощью фикоэритрин-меченных МКА (PE-CD33, PE-CD13 и PE-CD19, Caltag, США). Для этого 5×10⁵ клеток инкубировали с 20 мкл МКА 30 мин при 4 °C и дважды промывали PBS, ресуспендировали в PBS и анализировали экспрессию антигенов в гранулоцитарном и лимфоцитарном гейтах, как указано выше. Значимыми считали данные выше 10 % для CD34, CD19 и более 20 % для остальных антигенов [3; 10; 34].

Кинетические кривые экспрессии антигенов получали на основании данных экспрессии антигенов в гранулоцитарном и лимфоцитарном гейтах (в %) в тех же пробах Ph⁺-клеток, в которых анализировали их дифференцировку по морфологии. Кинетику изменения концентрации CD34⁺-клеток (10⁶/мл) рассчитывали, используя изменения %-ного содержания гранулоцитов и лимфоцитов при культивировании по данным морфологии (что определяет погрешности в концентрации CD34⁺-клеток в 10–20 %) и изменения концентрации клеток в процессе культивирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью выявить возможность образования лейкозного злокачественного клона на ранних этапах ХФ ХМЛ (при установлении диагноза) мы исследовали кинетику экспрессии антигенов и дифференцировки морфологически различимых Ph⁺-клеток ПК больного в хронической фазе ХМЛ при культивировании однократно взятой пробы Ph⁺BCR/ABL⁺-моноклеаров в суспензионной культуре. Такой подход позволяет оценить дифференцировочный и пролиферативный потенциалы Ph⁺-клеток больного на момент отбора пробы в некотором временном развитии *in vitro*, что проанализировано в [2].

На рис. 1 и 2 представлены кинетические кривые экспрессии всех антигенов (рис. 1 и 2, А и Б) и каждого антигена (рис. 1 и 2, В и Г) в процессе культивирования после разделения проб клеток в гранулоцитарном и лимфоцитарном гейтах. Кинетика дифференцировки клеток гранулоцитарного ростка кроветворения по данным морфологии дана на рис. 3, а на рис. 4 приведены кривые роста Ph⁺-моноклеаров и составляющих их гранулоцитов и лимфоцитов, а также отношение P/D количества клеток, делящихся и созревающих без деления; в присутствии факторов роста –

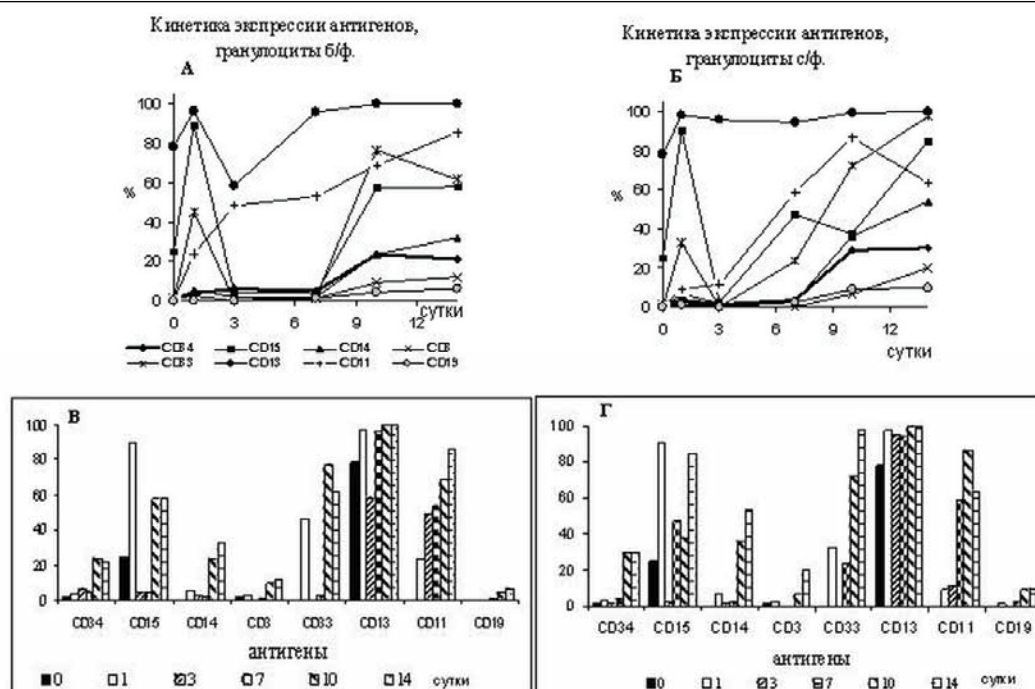


Рис. 1. Кинетические кривые экспрессии 8 антигенов (CD34, CD33, CD15, CD14, CD13, CD11b, CD3 и CD19) в процессе культивирования Ph^+ -моноклеаров периферической крови хронической фазы ХМЛ без факторов роста (А, В) и с факторами роста (Б, Г), выявляемой в гранулоцитарном гейте цитофлюориметра FASCan, Beckton Dickinson:

- А – кинетические кривые экспрессии всех антигенов без факторов роста;
- Б – кинетические кривые экспрессии всех антигенов с факторами роста (в присутствии ИЛ3 и Г-КСФ);
- В – кинетические кривые экспрессии каждого антигена без факторов роста;
- Г – кинетические кривые экспрессии каждого антигена с факторами роста.

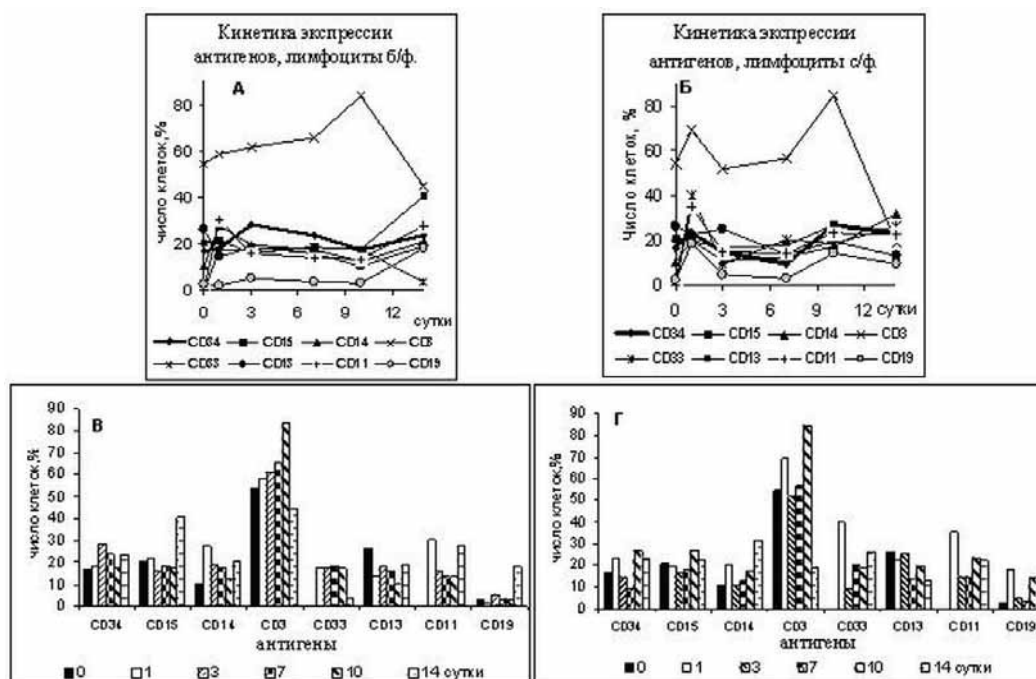


Рис. 2. Кинетические кривые экспрессии 8 антигенов (CD34, CD33, CD15, CD14, CD13, CD11b, CD3 и CD19) в процессе культивирования Ph^+ -моноклеаров ПК ХФ ХМЛ без факторов (А, В) и с факторами (Б, Г), выявляемой в лимфоцитарном гейте:

- В – кинетические кривые экспрессии каждого антигена без факторов;
- Г – кинетические кривые экспрессии каждого антигена с факторами.

(рис. Б) и без факторов – (рис. А). Во всех случаях, в том числе при экспрессии антигенов, видно активизирующее влияние цитокинов.

Для иммунофенотипирования были выбраны моноклональные антитела (МКА): на CD34, CD33, CD15, CD14, CD13, CD11b, CD3 и CD19-антигены [3; 10] на том основании, что исходные Ph^+ -моноклеары при ХМЛ, кроме миелоидных и лимфоидных предшественников, содержат и более дифференцированные клетки, что видно на рис. 3 и 4. Последние образуются также в процессе дифференцировки при культивировании.

Видно (см. рис. 3, 4), что при 14-сут культивировании *in vitro* Ph^+BCR/ABL^+ -моноклеаров ПК больного ХМЛ с мРНК b3a2 *BCR/ABL*, кроме дифференцировки и апоптоза по схеме, характерной для миелопоэза при ХМЛ [6–9; 12–15], идентифицируется также длительная экспрессия антигенов CD34 на клетках в гранулоцитарном и лимфоцитарном гейтах (см. рис. 1 и 2) и, следовательно, пролиферация соответствующих $CD34^+$ -клеток. Их содержание в гранулоцитарном и лимфоцитарном гейтах колеблется от 1 до 30 % и от 17 до 27 % соответственно.

На рис. 3, где приведены кинетические кривые пролиферации и дифференцировки, а также влияние на эти процессы факторов роста (см. рис. 3, Б), видно, что Ph^+ -гранулоциты последовательно пролиферируют и дифференцируются с образованием бластов, промиелоцитов с максимумом на 1-е сут и миелоцитов с максимумом накопления на 7-е сут, и далее метамиелоцитов и зрелых нейтрофилов. В совокупности эти результаты подтверждают, что в данной суспензионной культуре Ph^+ -клетки ПК больного ХМЛ пролиферируют и дифференцируются в соответствии со схемой миелопоэза в ХФ ХМЛ [6–9; 12–15; 26; 27].

При этом четко прослеживается механизм гранулоцитопоэза и влияние на него факторов роста. Видно, что факторы ускоряют дифференцировку особенно созревающих клеток и как следствие ускоряют гибель зрелых клеток. Основную массу клеток составляют миелоциты. К 10-м сут культивирования концентрация миелоцитов резко падает и далее уменьшается в присутствии дополнительных факторов на порядок; при их отсутствии концентрация к 10-м сут уменьшается заметно меньше, а к 14-м сут даже несколько возрастает. При недостатке факторов

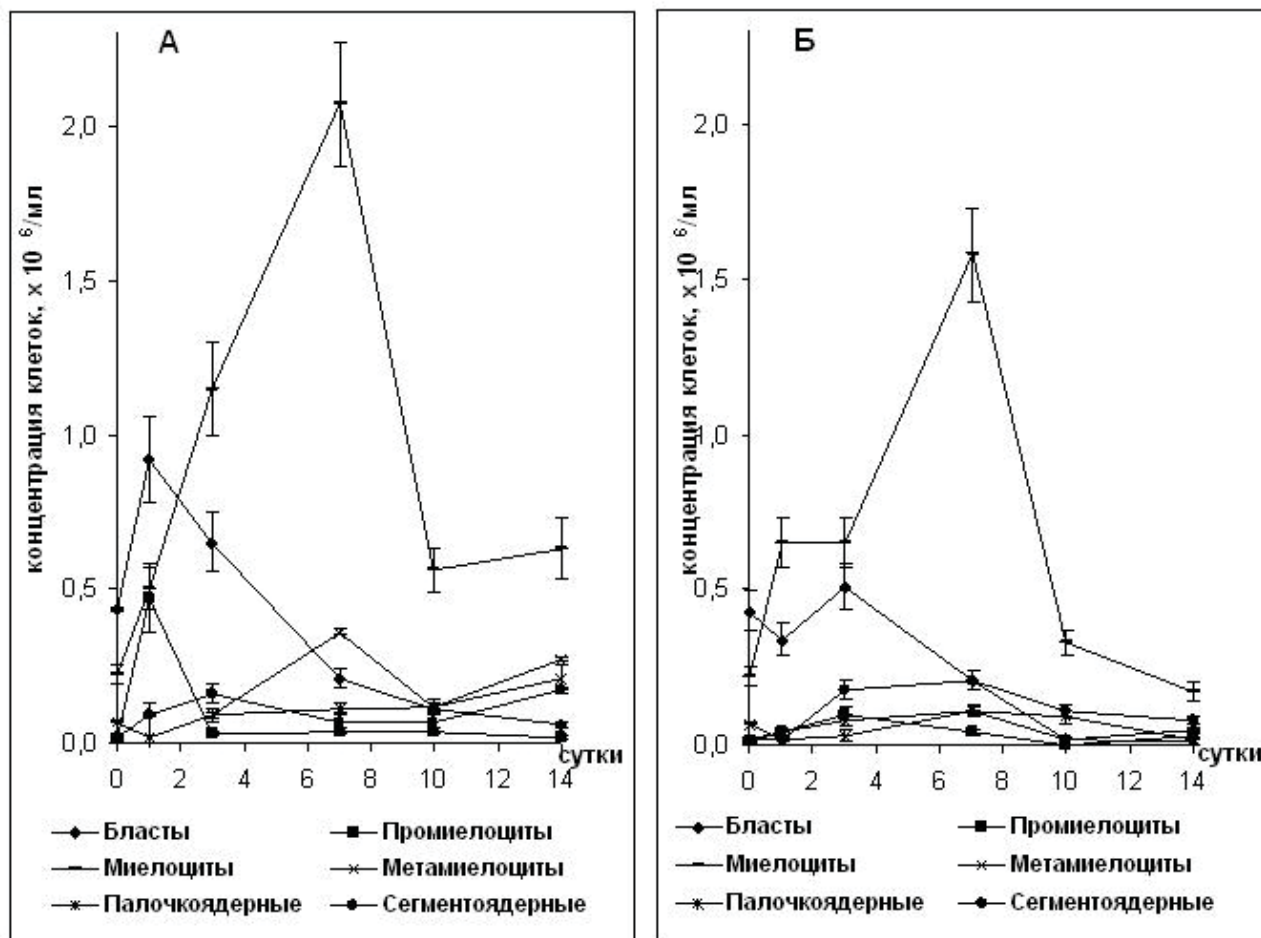


Рис. 3. Кинетические кривые дифференцировки (накопления и расходования) Ph^+ -гранулоцитов при культивировании Ph^+ -моноклеаров ПК ХФ ХМЛ без факторов роста (А) и с факторами (Б) (в присутствии ИЛ3 и Г-КСФ):

А – альфа-DMEM среда + 20 % фетальной бычьей сыворотки;

Б – ИЛ3 в 10 % по объему кондиционированной среды из клеток U5637 [28] и 100 нг/мл Г-КСФ.

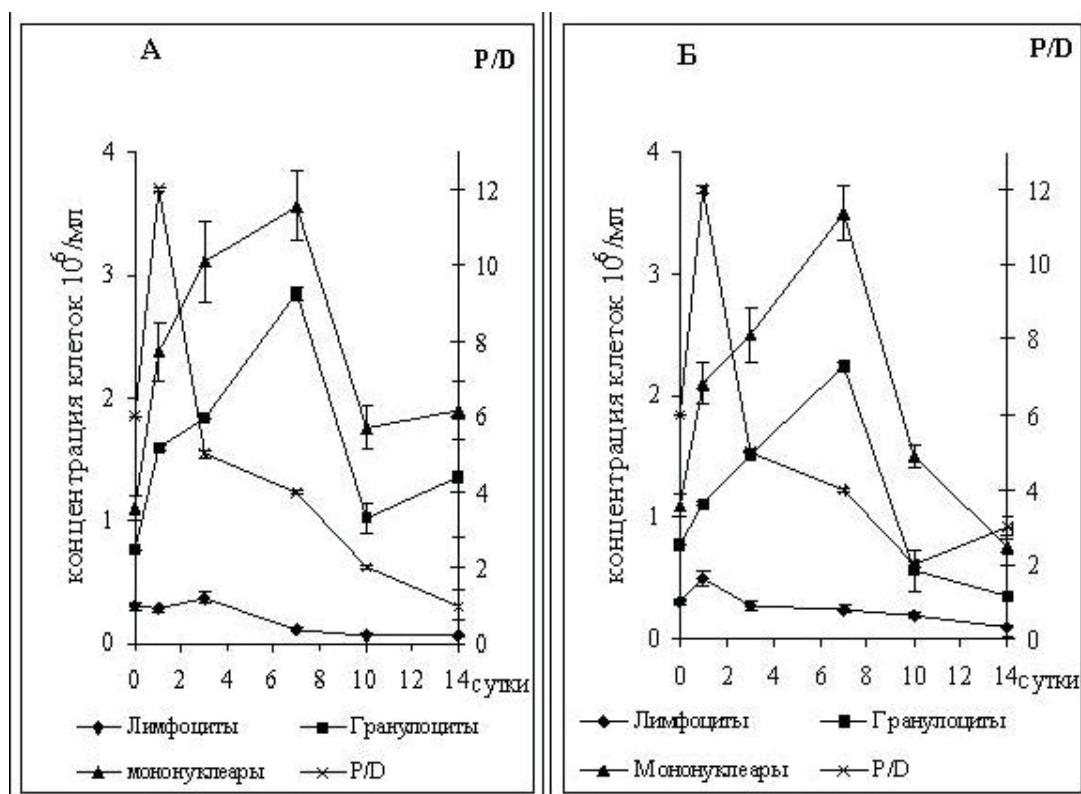


Рис. 4. Кинетические кривые накопления и расходования Rh^+ -мононуклеаров, Rh^+ -гранулоцитов и Rh^+ -лимфоцитов, а также изменения индекса P/D для гранулоцитов при культивировании без факторов роста (А) и в присутствии факторов роста (Б):

P/D выражает отношение пролиферирующих и дифференцирующихся с делением гранулоцитов (незрелых, P, к гранулоцитам, дифференцирующимся без деления (созревающим и зрелым нейтрофилам, D).

наблюдается торможение дифференцировки, а в присутствии факторов роста видна повышенная скорость созревания нейтрофилов и их апоптоза. После завершения дифференцировки и выхода зрелых клеток в апоптоз с 10 до 14 сут культивирования концентрация клеток падает; виден новый рост концентрации клеток, который заметно зависит от присутствия в среде цитокинов ИЛ3 и Г-КСФ (см. рис. 3, А и Б). Эти цитокины, как известно, участвуют в активации дифференцировки миелоидного ростка гемопоэтических клеток [4; 5; 12–14; 24].

Согласно [2] изменение отношения количества делящихся и созревающих без деления клеток, P/D, на рис. 4 выявляет активную пролиферацию клеток в начале и новый этап пролиферации в конце культивирования в присутствии факторов роста. Наблюдаемый рост концентрации клеток в конце культивирования одновременно с активацией пролиферации в виде нового этапа увеличения отношения P/D предполагает пролиферацию самоподдерживающихся клеток и возможное клонирование злокачественных лейкозных бластов – Rh^+ -клеток, теряющих способность к дифференцировке. Анализируя экспрессию CD34, CD33, CD15, CD13, CD14, CD3, CD11 и CD19-антигенов в Rh^+ -клетках (см. рис. 1 и 2), мы попытались идентифицировать клетки, участвующие в поздней пролиферации.

Характер кривой $CD34^+$ -клеток (см. рис. 1, А и Б) из гранулоцитарного гейта свидетельствует, что пролиферация этих клеток начинается после 7 сут культивирования и возрастает к 10 сут до 24 % в отсутствии факторов и до 30 % в их присутствии. $CD34$ -антиген в течение 0–7 сут в гранулоцитарном гейте практически отсутствует. Рис. 1, В, Г и рис. 2, В, Г показывают кинетику экспрессии каждого антигена. Видно, что до 7 сут все $CD34^+$ -клетки как более ранние предшественники попадают в лимфоцитарный гейт (от 17 до 24 %, см. рис. 2). На 10–14-е сут в гранулоцитарном гейте тоже появляются $CD34^+$ -клетки, относящиеся согласно экспрессии антигенов (см. рис. 1), и схеме биомаркеров антигенов (рис. 5), вероятно, к $Rh^+CD34^+CD33^+KOE$ -ГМ-клеткам. Это клетки-предшественники (бласты), которые могли возникнуть на позднем этапе культивирования только при делении следов $CD34^+$ -клеток по механизму самоподдержания с выходом из G_0 в G_1 фазу клеточного цикла. Наблюдаемую на 1-е сут эффективную экспрессию $CD33$ -антигена (рис. 1, В, Г) следует отнести к экспрессии небольшого количества миелобластов и промиелоцитов, дифференцировка которых в первые сутки согласно рис. 4 достигает максимума.

Как видно (см. рис. 1 и 2), активное накопление $CD34^+$ -клеток происходит при значительном умень-

согласно [11]

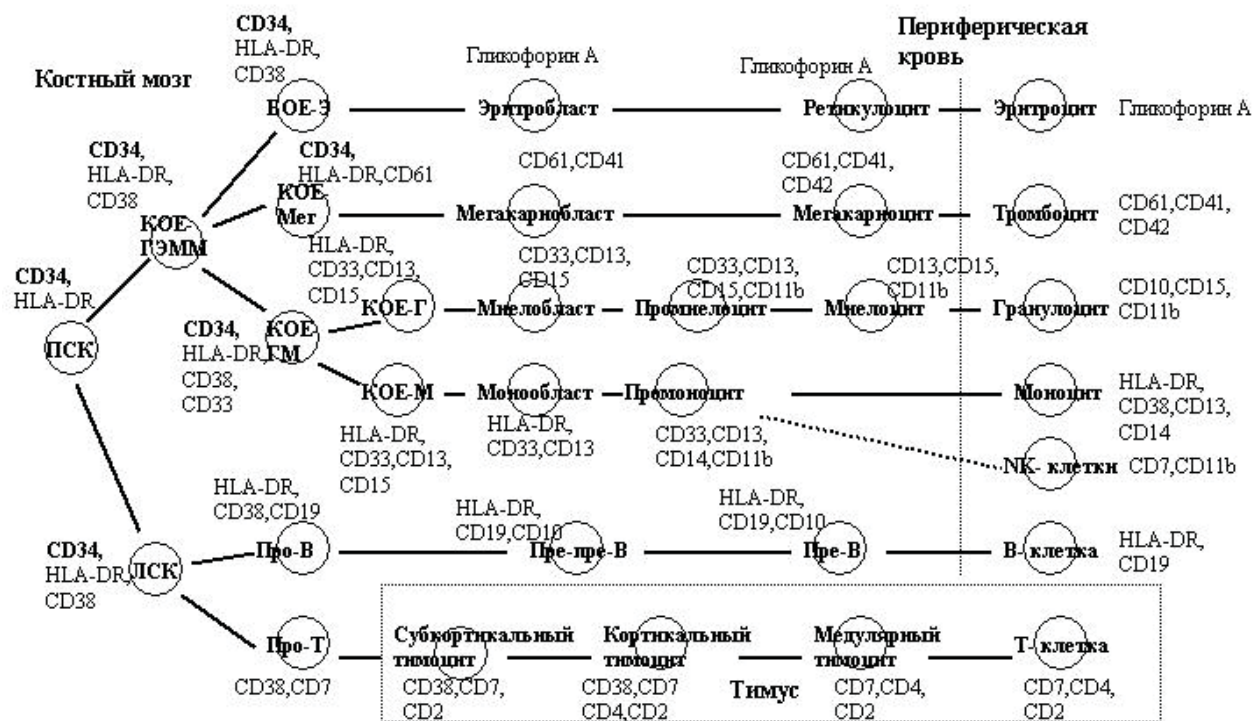


Рис. 5. Схема экспрессии антигенных биомаркеров при гемопоэзе согласно [11]

Сопоставление рис. 1, А, Б и рис. 3, А, Б показывает, что кинетическая кривая образования и расходования дифференцирующихся гранулоцитов по данным морфологии с высоким содержанием миелоцитов в течение всего времени культивирования (см. рис. 3) соответствует количественной экспрессии антигена CD13 (см. рис. 1) и экспрессии антигенных маркеров гемопоэза (схема на рис. 5 по [11]). Экспрессия CD11b растет по ходу дифференцировки от промиелоцитов до зрелых гранулоцитов. Экспрессия остальных антигенов: CD34, CD33 и CD15 имеет 2-фазный характер. 1-я фаза – 0–3 сут культивирования (см. рис. 1) с активной быстро завершающейся пролиферацией и дифференцировкой бластов (см. рис. 3), и 2-я фаза – 7–14 сут – медленное созревание клеток и рост экспрессии соответствующих антигенов. При этом CD34 экспрессируется только после 7 сут культивирования почти синхронно с CD33, CD15, CD 11b и CD14. Последний антиген, вероятно, указывает на некоторую экспрессию моноцитов. Отсутствие экспрессии CD34 и CD14 в гранулоцитарном гейте в начале культиви-

Из рис. 2 видно, что в данном образце мононуклеаров ПК наблюдаются 2 пика пролиферации согласно индекса P/D [2]: 1-й – активный в начале культивирования (0–3 сут) и 2-й – менее активный и более медленный – в конце (на 10–14-е сут). Различия в активации пролиферации гранулоцитов особенно видны

при культивировании в присутствии факторов (см. рис. 3, Б и 4, Б). Индекс P/D – отношение всех делящихся клеток к неделящимся в процессе культивирования – можно рассматривать в качестве меры пролиферации (по [6] – индекс созревания).

Отметим, что рост накопления $CD34^+$ -предшественников миелоидных клеток и $CD34^+$ -лимфоцитов в процентах к моменту значительного падения концентрации всех других клеток может приводить к увеличению содержания остающихся клеток, поэтому на рис. 6 приведена кинетика изменения концентрации $CD34^+$ -предшественников миелоидных клеток, лимфоцитов и суммы $CD34^+$ -клеток ($CD34^+$ -бластов) при культивировании с факторами роста и без них. Видно, что основное количество $CD34^+$ -клеток представлено $CD34^+$ -предшественниками миелоидных клеток (гранулоцитов) и что оно действительно растет с падением концентрации Ph^+BCR/ABL^+ -клеток на 10–14-е сут культивирования. Накопление клеток при этом имеет двухфазный характер (рис. 6) аналогично кинетике экспрессии других исследованных антигенов (см. рис. 1 и 2). Видно, что со временем экспрессия антигена $CD34$ на предшественниках миелоидных клеток падает к 14-м сут после некоторого накопления на 10-е сут культивирования, что указывает на активную

пролиферацию $CD34^+$ -клеток, выходящих из G_0 цикла в присутствии факторов роста, и их дифференцировку, видимо, частичную.

В совокупности эти данные могут означать выход из G_0 цикла предшественников дифференцирующихся Ph^+BCR/ABL^+ -клеток ($D-Ph^+BCR/ABL^+$ -клеток) в ответ на резкое падение концентрации Ph^+BCR/ABL^+ -клеток в среде и, возможно, новый этап их дифференцировки на 10–14-е сут культивирования. Наблюдаемая экспрессия антигенов $CD33$, 15 и 11b на этом этапе культивирования (см. рис. 1) не противоречит предположению о параллельно протекающей медленной дифференцировке $CD34^+$ -клеток.

Экспрессия антигенов клеток лимфоцитарного гейта (см. рис. 2) также демонстрирует 2-фазную экспрессию исследованных антигенов. Превалирующая экспрессия $CD3$ -антигена, относящаяся к Т-лимфоцитам, в начале культивирования соответствует этапу активной пролиферации клеток-предшественников в составе бластов на 0–7-е сут (см. рис. 2 и 6). Кроме $CD3$ в этой фазе синхронно экспрессируются антигены $CD34$, $CD11b$, $CD33$, $CD14$, $CD19$, $CD14$, $CD13$; во 2-й фазе на 7–14-е сут культивирования экспрессируются антигены $CD3$, $CD34$, $CD19$. Однако наблюдаемые значения $CD14$, $CD33$ и $CD11b$ ниже информативных 10–20 %.

В гранулоцитарном гейте $CD34^+$ -клетки обнаруживаются только в конце культивирования Ph^+ -клеток; и их экспрессия коррелирует с экспрессией антигена $CD33$ (см. рис. 1). $CD34$ -антиген в лимфоцитарном гейте также экспрессируется в виде 2 фаз, более выраженных и разделяющихся при культивировании в присутствии факторов роста, с существенной активацией экспрессии к концу культивирования (см. рис. 2).

Отметим, что в это же время по данным морфологии в 1-й фазе активно дифференцируются бласты (максимум в 1–3-е сут, см. рис. 3). Эти бласты по отношению к ростовым факторам представлены неоднородными клетками. Часть из них дифференцируются с максимумом на 1-е сут (вероятно, КОЕ-ГМ), а другая часть – вероятно, КОЕ-Г и/или миелобласты ($CD33^+$, $CD13^+$, $CD15^+$) – позже – на 3-е сут (см. рис. 3). Отсутствие экспрессии антигенов $CD33$, $CD15$, $CD14$, $CD15$ и $CD11b$ на гранулоцитах от 0 до 7 сут и увеличение их экспрессии на 10–14 сут (см. рис. 1) означает, что некоторая часть этих клеток дифференцируется во времени аналогично пику бластов (см. рис. 3). В соответствии с дифференцировкой и значительным накоплением миелоцитов на 3–10-е сут наблюдается повышенная экспрессия $CD13$, $CD15$ и $CD11b$ -антигенов, которые соответствуют миелоцитам и характеру их экспрессии. Что касается других морфологически определяемых Ph^+ -клеток (см. рис. 1, 2), то их экспрессия по кинетике и биомаркерам вполне согласуется с известной экспрессией соответствующих антигенов (схема рис. 5 согласно [11]).

Кинетика небольшой дифференцировки Ph^+ -лимфоцитов на 1–3-е сут по морфологии (см. рис. 4) и экспрессии $CD34$ антигена (см. рис. 2, 6) также выяв-

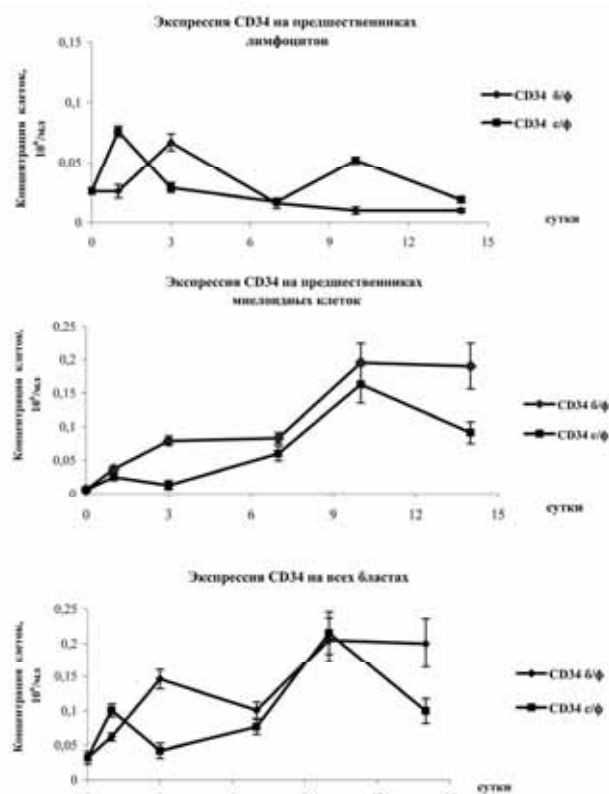


Рис. 6. Кинетические кривые изменения концентрации $CD34^+$ -клеток, экспрессирующих антиген $CD34$ на предшественниках лимфоцитов, миелоидных клеток и на их сумме (бластах) при культивировании Ph^+ -мононуклеаров ПК ХФ ХМЛ без факторов (б/ф) и с факторами роста (с/ф, в присутствии ИЛ3 и Г-КСФ)

ляет неоднородность фракции лимфоцитов: ранний пик – 1-е сут, поздний – 3-е сут на рис. 2. Дифференцировка раннего пика ускоряется в присутствии факторов и позволяет наблюдать более поздний пик. Экспрессия антигенов CD34 на клетках лимфоцитарного гейта (см. рис. 2, 6) при культивировании без факторов выражена максимумом на 2–3-е сут и дальнейшим падением; а с факторами – двумя максимумами на 2–3-е и 10-е сут культивирования.

Совокупность полученных данных (см. рис. 6, а также рис. 1 и 2) обнаруживает 2-фазную экспрессию антигена CD34 на предшественниках гранулоцитов и лимфоцитов при продолжительности фаз около 7 сут. Соотношение образующихся во 2-й фазе CD34⁺-предшественников гранулоцитов и CD34⁺-лимфоцитов составляет 4 к 1. В 1-й фазе обнаруживающиеся CD34⁺-клетки скорее всего дифференцируются. Во 2-й фазе культивирования при корреляции со значительным падением концентрации дифференцирующихся Ph⁺-клеток стимулируется пролиферация CD34⁺-клеток. Пролiferация на 2-м этапе после 10 сут культивирования протекает, очевидно, благодаря активации перехода клеток из G₀ в G₁ фазу клеточного цикла, которые в присутствии факторов роста частично дифференцируются с экспрессией антигенов CD34, CD33, CD13, и CD15 (миелоидные клетки) и CD19 (В-лимфоциты). В отсутствие факторов роста CD34⁺-клетки накапливаются и, по-видимому, снова консервируются в G₀.

Концентрация CD34⁺-предшественников миелоидных клеток существенно (примерно на порядок) увеличивается к 10-м сут (рис. 1 и 6). Далее в присутствии факторов она падает в 2 раза, что сопровождается существенно более активной, синхронной с антигеном CD34, экспрессией антигенов CD33, CD15 и CD11b, чем при отсутствии факторов (см. рис. 1). Это позволяет предполагать способность CD34⁺-предшественников миелоидных клеток к пролиферации и, возможно, к дифференцировке на 2-м этапе их накопления (см. рис. 1 и 6).

Итак, в суспензионной культуре Ph⁺-моноклеаров ПК большого ХМЛ с мРНК b3a2 *BCR/ABL* после завершения основной части дифференцировки и апоптоза дифференцирующихся по механизму миелопоэза Ph⁺-клеток обнаруживается также пролиферация CD34⁺-клеток с экспрессией антигена CD34 на предшественниках гранулоцитов и лимфоцитов. Эти Ph⁺CD34⁺-клетки, вероятно, могут быть злокачественными лейкозными бластами с блоком дифференцировки (т.е. ЛСК), а также потомками ПСКК Ph⁺ CD34⁺-клеток или ПСКК Ph⁺ CD34⁺-клеток. Накопление CD34⁺-клеток во 2-й фазе культивирования происходит, как предполагается, в результате выхода этих клеток в клеточный цикл из G₀ фазы при значительном уменьшении концентрации Ph⁺-клеток в среде и активации факторами роста. Одновременная экспрессия антигенов CD34 на предшественниках гранулоцитов и лимфоцитов в исследованных Ph⁺-клетках может означать транслокацию и, возможно, дополнительную мутацию в их раннем предшественнике –

полипотентной стволовой кроветворной клетке (ПСКК) или ранее в гемопоэтической стволовой клетке.

Поскольку транслокация с образованием Ph⁺-хромосомы и последующая мутация в Ph⁺-клетках происходили не в их G₀ фазе, а после выхода в клеточный цикл и после пролиферации клеток, то злокачественные лейкозные CD34⁺-бласты должны пройти достаточно длинный путь до становления клона, даже если они возникли при хромосомной транслокации и сразу в единственной клетке СКК. Сравнение кинетики экспрессии антигенов (см. рис. 1 и 2) с кинетикой дифференцировки гранулоцитов и лимфоцитов по данным морфологии в тех же пробах (см. рис. 3 и 4) в сочетании с известной схемой экспрессии антигенов – биомаркеров, экспрессирующихся при гемопоэзе по [11] (см. рис.5), позволяет соотнести их между собой и четче идентифицировать этапы дифференцировки и экспрессии антигенов.

Низкая экспрессия антигена CD34 на лимфоцитах при низкой экспрессии CD19 и очень высокой экспрессии CD3, соответствующих накоплению В- и Т-лимфоцитов, служит косвенным свидетельством неучастия предшественников Т-лимфоцитов в транслокации (т.е. Т-лимфоциты остаются Ph⁺-клетками). Одновременное образование CD34⁺-клеток, предшественников миелоидных клеток и лимфоцитов, хорошо известно при смешанном типе бластного криза ХМЛ, что встречается в 30 % случаев [3].

Согласно современным представлениям о механизмах прогрессии лейкозов формирование злокачественного этапа болезни происходит в результате образования, становления клона и функционирования лейкозных стволовых клеток (ЛСК). Образование этих клеток может протекать при хромосомных транслокациях, последующих мутациях и/или специфических изменениях генной регуляции клеток [16; 17; 21; 23; 25; 29–32].

В зависимости от вида хромосомной транслокации клон ЛСК возникает либо сразу из стволовой кроветворной клетки (СКК), либо поэтапно. Вначале возникают трансформированные клетки, сохраняющие способность к мультипотентному кроветворению, которые затем мутируют в ЛСК [30]. D-Ph⁺-клетки превращаются в клон ЛСК вследствие мутаций не только в стволовых клетках, но и в их специализированных потомках – полипотентных, коммитированных предшественниках и даже в созревающих клетках [23; 21; 30]. При этом ЛСК подобно СКК способны к длительному самоподдержанию (посредством сохранения значительной доли клеток в G₀ фазе клеточного цикла), но не способны к дифференцировке [23]. Ранее показано, что CD34⁺-бласты при ХМЛ выходят в G₀ /G₁ фазу клеточного цикла значительно быстрее нормальных CD34⁺-клеток КМ [33].

Полученных в работе данных однако недостаточно для выбора, являются ли CD34⁺-клетки, накапливающиеся во второй фазе культивирования, злокачественными ЛСК или они наследуют способность СКК

к самоподдержанию благодаря исходной транслокации в СКК или ПСКК. Поэтому во второй фазе культивирования в ответ на значительное падение концентрации D-Ph⁺-клеток скорее всего начинается новый этап пролиферации самоподдерживающихся клеток, еще способных к дифференцировке в качестве наследников СКК, претерпевших транслокацию t(9,22).

Кинетика экспрессии антигена CD34 на предшественниках миелоидных клеток, лимфоцитов и их сумме (бластах) (см. рис. 6) позволяет выявить дополнительные свойства пролиферирующих во второй фазе культивирования CD34⁺-клеток. Видно, что в 1-й фазе экспрессии (0–7 сут культивирования) пролиферация и дифференцировка всех CD34⁺-бластов (предшественников миелоидных клеток, лимфоцитов и всех обнаруженных CD34⁺-клеток) ускоряется и что ускорение зависит от цитокинов ИЛ-3 и Г-КСФ, регулирующих миелопоэз клеток-предшественников [4; 5; 12–14; 24]. Во 2-й фазе культивирования экспрессия антигена CD34 свидетельствует о начале нового этапа пролиферации CD34⁺-клеток. При этом в ответ на 5–10-кратное уменьшение концентрации всех D-Ph⁺-клеток (см. рис. 3) концентрация CD34⁺-предшественников миелоидных клеток и всех CD34⁺-клеток увеличивается к 10-м сут на порядок (см. рис. 6). Далее количество первых CD34⁺-клеток (миелоидных бластов) без факторов роста консервируется, а в присутствии факторов частично дифференцируется с экспрессией антигенов CD33, CD13, CD 15, CD 11b на более зрелых гранулоцитах, но лишь с 2-кратным уменьшением концентрации этих CD34⁺-клетках-предшественниках гранулоцитов и всех CD34⁺-бластов. Отметим, что CD34⁺-лимфоциты в отсутствии факторов роста пролиферируют в основном в 1-й фазе культивирования; их концентрация увеличивается всего в 3 раза (см. рис. 6, А); они дифференцируются с максимумом на 3-е сут до весьма низкой концентрации, которая далее, в том числе и во второй фазе, мало меняется (см. рис. 4, А, Б). В присутствии факторов максимум пролиферации и экспрессии антигена CD34 смещается к 1-м сут (см. рис. 4 и 6). Во 2-й фазе к 10-м сут концентрация временно удваивается и к 14-м сут падает вновь, т.е. CD34⁺-предшественники лимфоцитов делятся, увеличивая свою концентрацию в 3 раза и затем полностью дифференцируются во 2-й фазе культивирования, как и в 1-й (см. рис. 6).

Совокупность изложенных данных позволяют предположить, что во 2-й фазе культивирования функционируют иные CD34⁺-предшественники миелоидных клеток, чем в 1-й. Эти клетки, вероятно, пролиферируют, выходят из G₀ фазы клеточного цикла и являются самоподдерживающимися CD34⁺-предшественниками гемопоэтических клеток, которые консервируются в отсутствии факторов роста, а в присутствии факторов частично дифференцируются в CD34⁺, CD33⁺, CD13⁺, CD15⁺, CD11b⁺-гранулоциты. CD34⁺-предшественники лимфоцитов ПК данного ХМЛ таким свойством не обладают.

Известно, что лейкозные стволовые клетки быстрее выходят из G₀ в G₁ фазу клеточного цикла, чем СКК доноров. Они снова легко консервируются в G₀ и стимулируют секрецию цитокинов [16; 24; 26; 30; 33]. То обстоятельство, что CD34⁺-бласты способны активно пролиферировать с факторами роста в среде и без них (см. рис. 6, 2-я фаза), указывает на стимулирование в этих клетках секреции цитокинов, концентрации которых, возможно, недостаточно для последующей полной дифференцировки. Замедленная пролиферация CD34⁺-клеток только в конце культивирования и то, что CD34⁺-предшественники миелоидных клеток 2-го этапа пролиферации дифференцируются не полностью, является единственным указанием на то, что они могут быть ЛСК или их промежуточной формой, способной к самоподдержанию и стимуляции аутокринной секреции факторов роста, необходимых для самоподдержания, но еще сохраняющие в какой-то степени способность к дифференцировке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена кинетика экспрессии 8 антигенов (CD34, CD33, CD15, CD14, CD13, CD11b, CD3 и CD19) при культивировании Ph⁺BCR/ABL⁺-клеток, образующихся при хромосомной транслокации t(9,22) при хроническом миелолейкозе в сравнении с кинетикой дифференцировки, тестируемой по морфологии клеток. При 14-сут культивировании *in vitro* Ph⁺BCR/ABL⁺-моноклеаров периферической крови больного ХМЛ с мРНК b3a2 BCR/ABL, кроме дифференцировки и созревания клеток по схеме, характерной для миелопоэза при ХМЛ, идентифицирована также 2-фазная пролиферация CD34⁺-предшественников миелоидных клеток и лимфоцитов. Активное накопление CD34⁺-клеток происходит в конце культивирования Ph⁺-моноклеаров при значительном уменьшении их концентрации в результате дифференцировки и апоптоза. Образование значительного количества CD34⁺-клеток в конце культивирования объясняет 2-й этап активации пролиферации Ph⁺-клеток и роста индекса P/D.

Кинетика экспрессии антигена CD34 и других исследованных антигенов имеет двухфазный характер с существенной активацией экспрессии антигенов в том числе в конце культивирования, что коррелирует с 2-этапной пролиферацией клеток, определяемой по морфологии, и указывает на дифференцировку CD34⁺-клеток на 1-м этапе и активацию их пролиферации на 2-м (7–14 сут). Пролиферация CD34⁺-клеток, состоящих преимущественно из CD34⁺-предшественников миелоидных клеток, происходит, как предполагается, в результате выхода CD34⁺-клеток из G₀ фазы клеточного цикла с последующей частичной дифференцировкой в присутствии цитокинов и консервацией в G₀ без них. Одновременная экспрессия антигенов CD34 на предшественниках миелоидных клеток и лимфоцитов в исследованных Ph⁺-моноклеарах указывает на хромосомную транслокацию t(9,22) у данного больного ХМЛ в раннем предшественнике – полипотентной стволовой клетке или даже ранее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов М.Г. Гематологический атлас. – М.: Медицина, 1985. – 344 с.
2. Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Саркисян Г.П. и др. Кинетика пролиферации, дифференцировки и транскрипции генов, регулирующих апоптоз, BCR/ABL⁺Ph⁺-клеток человека в культуре *in vitro* // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 8. – в печати.
3. Барышников А.Ю., Кадагидзе Э.Г., Махонина Л.А., Тутицин Н.Н. Иммунологический фенотип лейкозной клетки. – М.: Медицина, 1989. – 240 с.
4. Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г. Роль ростовых факторов в регуляции кроветворения // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т. 45, № 6. – С. 6–8.
5. Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста. В кн.: Биологические основы противоопухолевой терапии. – Агат-Мед, 2001. – С. 5–32.
6. Руководство по гематологии. – Под ред. А.И. Воробьева. – М.: Ньюдиамед, 2002. – Т. 1. – 280 с.
7. Герасимова Л.П., Манакова, Т.Е., Ахлынина и др. Экспрессия онкогена BCR/ABL и p53-индуцированный апоптоз в суспензионных культурах гемопоэтических Ph⁺ клеток при хроническом миелолейкозе // РБЖ. – 2002. – Т. 1, № 4. – С. 29–38.
8. Козинец Г.И., Котельников В.М. Кинетика гемопоэза и ее клиническое значение // Советская медицина. – 1983. – № 4. – С. 73–7.
9. Котельников В.М., Козинец Г.И., Касаткина В.В., Ковалевская Н.П. Кинетика гранулоцитопоэза. В кн.: Кинетические аспекты гемопоэза. – Томск: Издание Томского Государственного университета, 1982. – С. 149–211.
10. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тутицин Н.Н. Фенотипирование в диагностике гемобластозов. – М., Тверь: Триада, 2005. – 166 с.
11. Маркина И.Г., Тутицин Н.Н., Андреева Л.Ю. Использование иммунофенотипирования для совершенствования диагностики и прогнозирования результатов терапии острых и лимфобластных лейкозов // РБЖ. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 3–13.
12. Натан Д.Г., Зифф К.А. Регуляция кроветворения // Гематология и трансфузиология. – 1994. – Т. 39, № 2. – С. 3–10.
13. Патологическая физиология крови. – Под ред. Шиффман Ф.Д. – BINOM Publishers, 2000. – 446 с.
14. Чертков И.Л., Дризе Н.И. Взлет и падение гематологии за ¾ века // Гематология и трансфузиология. – 2001. – Т. 46(3). – С. 10–4.
15. Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C. et al. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in CML // Blood. – 1995. – Vol. 86. – P. 148–58.
16. Buckle A.M., Mottram R., Pierce A. et al. The effect of Bcr-Abl protein tyrosine kinase on maturation and proliferation of primitive haematopoietic cells // Mol. Med. – 2000. – Vol. 6(10). – P. 892–902.
17. Coppo P., Bonnet M.L., Dusanter-Fourt I. et al. Constitutive and specific activation of STAT3 by BCR-ABL in embryonic stem cells // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22(26). – P. 4102–10.
18. Deininger V.N., Vieira S., Mendiola R. et al. BCR/ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia // *Cancer Research*. – 2000. – Vol. 60. – P. 2049–55.
19. Era T., Witte O.N. Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 97. – P. 1737–42.
20. de Groot J.R., Raaijmakers P.A.M., Lammers J.-W.J. et al. STAT5 Activation by BCR-Abl Contributes to Transformation of K562Leukemia Cells // *Blood*. – 1999. – Vol. 94. – P. 1108–12.
21. Guzman M.L., Jordan C.T. Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia // *Cancer Control*. – 2004. – Vol. 11(2). – P. 97–104.
22. Jaiswal S., Traver D., Miyamoto T. et al. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 10002–7.
23. Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Dylla S.J. et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast crisis CML // *New England J. Medicine*. – 2004. – Vol. 354. – P. 657–67.
24. Holyoake T.L., Jiang X., Jorgensen H.G et al. Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth in vitro in association with up-regulation of expression of interleukin-3 // *Blood*. – 2001. – Vol. 97. – P. 720–8.
25. Holyoake T.L., Jiang X., Eaves A.C., Eaves C.J. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia // *Leukemia*. – 2002. – Vol. 16. – P. 549–58.
26. Lotem, J., Sachs, L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes // *Leukemia*, – 1996. – Vol. 10 – P. 925–31.
27. Melo J.V. The diversity of the BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype // *Blood*. – 1996. – Vol. 88. – P. 2375–84.
28. Morioka E., Taniguchi S., Okamura S. et al. Purification of a granulocyte colone-stimulating factor from the conditioned medium of a subclone of human bladder carcinoma cell line 5637, HTB90 // *Res. Exp. Med.* – 1990. – Vol. 190 (4). – P. 229–38.
29. Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells via activation of STAT3 // *Genes & Development*. – 1998. – Vol. 12. – P. 2048–60.
30. Passegué E., Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Weissman I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 11842–9.
31. Shuai K., Halpern J., ten Hoeve J. et al. Constitutive activation of STAT5 by the BCR/ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia // *Oncogene*. – 1996. – Vol. 13(2). – P. 247–54.

32. Sillaber C., Gesbert F., Frank D.A. *et al.* STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells // *Blood*. – 2000. – Vol. 95. – P. 2118–25.

33. Traycoff C.V., Haistead B., Rice S. *et al.* Chronic myelogenous leukaemia CD34+cells exit G0/G1 phases of cell cycle more rapidly than normal marrow CD34+cells // *Brit. J. Haematology*. – 1998. – Vol. 102(3). – P. 759–67.

34. Turkina A.G., Baryshnikov A.Yu., Sedyakhina N.P. *et al.* Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous leukaemia patients: expression, activity and correlations with CD34 antigen // *Brit. J. Haematology*. – 1996. – Vol. 92. – P. 88–96.

Поступила 17.11.2006.

УДК 616-006-092.6:615.2/.3

D.V. Filonenko, N.V. Andronova, E.M. Treshalina, E.V. Stepanova, A.Yu. Baryshnikov

DEVELOPMENT OF TUMOR MODELS FOR PRECLINICAL INVESTIGATION OF THE NEW TARGET DRUGS AGAINST *HER2/NEU*

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

ABSTRACT

HER2/neu is the one from epidermal growth factor receptors family, which plays the important role in the etiology and pathogenesis of different kind of tumors. The most important significance this receptor has for the breast and ovarian cancer. The drug Herceptin, which are blocking this receptor, has been used at the clinical practice by the patients with breast cancer.

The development of the new effective and chip drugs against *HER2/neu* are perspective now. For testing of these drugs is necessary to have adequate tumor models *in vivo*. The purpose of this investigation was to receive the tumor models positive of *HER2/neu* on immunodeficient mice for the preclinical evaluation *in vivo* of the new drugs against *HER2/neu*. There are presented the results of subcutaneous transplantation of two human cell lines of breast cancer SKBR3 and ovarian SKOV3 to the mice *Balb/c nude* breded in Blokhin Russian Cancer Research Center. So presented the results of *HER2/neu* testing in the tumor passages *in vivo*.

Key words: receptor *HER2/neu*, subcutaneous xenografts of human cancer SKBR3 and SKOV3, mice *Balb/c nude*, adapt of models.

Д.В. Филоненко, Н.В. Андропова, Е.М. Трещалина, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ НОВЫХ АДРЕСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ *HER2/NEU*

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

HER2/neu – представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста, роль которого в этиологии и патогенезе ряда опухолей, в том числе рака молочной железы и рака яичников человека, считается доказанной. Препарат герцептин, блокирующий данный рецептор, внедрен в клиническую практику и с успехом применяется при лечении РМЖ. Перспективным является создание более эффективных и дешевых препаратов, направленных на данный рецептор. Для тестирования подобных препаратов необходимы адекватные модели. Целью данной работы была отработка моделей опухолевого роста на иммунодефицитных мышах для доклинического изучения *in vivo* новых препаратов против *HER2/neu*. Представлены результаты подкожной трансплантации 2 линий рака яичников и молочной железы человека SKOV3 и SKBR3 мышам *Balb/c nude* разведения ГУ РОНЦ, а также результаты тестирования экспрессии *HER2/neu* в полученных ксенографтах.

Ключевые слова: рецептор *HER2/neu*, подкожные ксенографты опухолей человека SKBR3 и SKOV3, мыши *Balb/c nude*, адаптация модели.

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря успехам молекулярной биологии на клетках различных злокачественных опухолей выявлен новый антиген семейства рецепторов эпидермального фактора роста *HER2/neu* (*ErbB2*), участвующий в этиологии и патогенезе ряда опухолей, в том числе рака молочной железы (РМЖ) и рака яич-

ников (РЯ) человека [2; 3; 7; 8; 14]. Благодаря этому создан адресный противоопухолевый препарат герцептин, представляющий собой гуманизированное полноразмерное моноклональное антитело против *HER2/neu*. Препарат герцептин (трастузумаб), выпускаемый фирмой «Roche», применяется при лечении рака молочной железы с гиперэкспрессией *HER2/neu*.

В результате достигается положительная динамика опухолевого процесса с увеличением выживаемости пациенток [1; 4; 5; 9; 10; 12]. Поиски новых препаратов против *Her2/neu* ведутся интенсивно во многих странах, в том числе и в нашей.

Для доклинического изучения препаратов, адресованных *HER2/neu*, используются адаптированные к росту у иммунодефицитных мышей клеточные линии опухолей человека с гиперэкспрессией рецептора (*HER2+*), среди которых наиболее широко используются 2 линии рака молочной железы SKBR3 и BT474 и рак яичников SKOV3 [6; 11; 13].

В ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в рамках Программы Правительства г. Москвы ведутся исследования по разработке новых противоопухолевых препаратов, ориентированных на *Her2/neu*.

Целью исследования была отработка моделей опухолей человека, положительных по *HER2* у мышей *Balb/c nude*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Для трансплантации культур клеток опухолей человека использованы конвенциональные мыши-самки *Balb/c nude* 8–10 нед массой тела 18–21 г. Мышей содержали в SPF-зоне специализированного кондиционированного бестимусного отсека при нормированном температурно-влажностном режиме на стерильном экструдированном корме («МЭСТ», РФ), стерильной воде и стерильной бумажной подстилке.

Линии клеток опухолей человека с гиперэкспрессией *HER2/neu*

1. SKOV3 – аденокарцинома яичника человека, содержащая на своей поверхности до 8×10^5 рецепторов *HER2/neu* на клетку. Эта линия клеток формирует подкожные ксенографты у *nude* мышей и отличается отсутствием рецепторов эстрогенных и прогестероновых гормонов. В связи с этим для ее трансплантации и роста не требуется создания гормонального фона, резко сниженного у мышей *nude*.

2. SKBR3 – аденокарцинома молочной железы человека, содержащая на своей поверхности до $1,6 \times 10^6$ рецепторов *HER2/neu* на клетку. Линия также формирует подкожные ксенографты у *nude* мышей и не требует создания гормонального фона для роста *in vivo*.

Трансплантация ксенографтов

Первый пассаж выполняли из культуры клеток в стандартных прививочных дозах, повторные – взвесью опухолевой ткани из полученных подкожных ксенографтов. Эта модификация предпринята с целью получения достаточного количества опухолевого материала для возможности постановки длительных химиотерапевтических экспериментов с использованием одного культурального пассажа. Для определения особенностей кинетики роста ксенографтов при повторном пассивировании выполнено по 2 пассажа.

1-й пассаж из культуры клеток. Под кожу бока мышей *nude* ($n=2$) инокулировали по 1×10^7 клеток SKBR3 или по 7×10^6 кл. SKOV3.

2-й пассаж из подкожных ксенографтов 1-го пассажа. Под кожу бока мышей ($n=2$) инокулировали взвесью опухолевых клеток по 60 мг/мышь в 0,3 мл питательной среды 199.

3-й пассаж из подкожных ксенографтов 2-го пассажа. Под кожу бока мышей ($n=5-6$) инокулировали взвесью опухолевых клеток по 60 мг/мышь в 0,3 мл питательной среды 199.

Для приготовления опухолевой взвеси опухоли выделяли, измельчали с помощью медицинских ножниц и *ex tempore* готовили взвесью клеток в питательной среде 199.

О стандартности моделей у мышей судили по 100%-ной прививаемости опухолей. Для выявления опухолевых узлов под кожей у мышей проводили визуальное наблюдение и пальпацию места трансплантации. За кинетикой опухолевого роста наблюдали в течение месяца после трансплантации по размерам опухолевых узлов. Пальпируемые узлы многократно измеряли и рассчитывали объем в динамике ($V=a \times b \times c$, мм³). Проведенные в разные сроки после трансплантации измерения опухолей позволили рассчитать средние объемы опухолей (V_{cp}) и соотношение последующего объема к предыдущему (V_n/V_{n-1} , где n – номер измерения). По этим параметрам построены кривые роста, которые использованы для определения длительности отдельных фаз. Анализ кривых использован для расчета стандартных показателей роста опухолей: длительности латентного периода (отсутствие пальпируемых опухолей), экспоненциальной фазы (≥ 3 -кратное увеличение размеров), стационарной фазы (отсутствие динамики роста или менее, чем 3-кратное увеличение размеров) и оценки скорости роста опухоли. Сроки гибели мышей от опухоли служили конечной точкой определения длительности стационарной фазы. Продолжительность жизни мышей с опухолью была дополнительным показателем стандартности модели.

Контроль экспрессии *HER2/neu*

Экспрессию *HER2+* контролировали предварительно в культурах клеток, использованных для первых пассажей опухолей, а также во всех пассажах опухолей у животных. Для этого из удаленной опухоли выделяли часть ткани, которую фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине в течение 24–48 ч, затем промывали в проточной водопроводной воде, фиксировали в 5 сменах этанола в течение 1–2 ч в каждой, в 2 сменах ксилола по 20 мин в каждой и в смеси ксилол/парафин 1 ч. Готовые срезы пропитывали парафином в течение 2 ч и заливали в парафин. Заключенные в парафин срезы опухоли подвергали ИГХ-исследованию.

Иммуногистохимическое исследование

ИГХ проводили по стандартной пероксидазной методике с использованием стрептавидин-биотиновой

системы визуализации. Для выявления антигенных детерминант обрабатывали срезы в 10 мМ цитратном буфере в течение 30 мин при 95–99 °С. Эндогенную пероксидазу блокировали 15 мин 3%-ной перекисью водорода, неспецифическое связывание – 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию с первичными антителами A0485 [«Dako», Дания] проводили в течение 18 ч при +4 °С. В качестве системы детекции выбран набор EnVision+ [«Dako», Дания], в качестве хромогена – ДАБ+ [«Dako», Дания]. Срезы докрашивали гематоксилином. Результаты окрашивания оценивали с использованием общепринятых критериев (Food and Drug Administration, FDA, США) (табл. 1).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка выполнена с использованием компьютерной программы Microsoft Excel. Достоверными считали отличия при $p < 0,05$. Все результаты фиксировали в специальных протоколах и оформляли в виде графиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отработка модели ксенографта SKBR3 *in vivo*

При 1-м пассаже 1×10^7 клеток на мышь пальпируемый опухолевый узел SKBR3 появился на 9-й день (латентная фаза) у обеих взятых в опыт мышей. Объемы опухолей у них резко различались и составили соответственно 2 и 24 мм³. У 1-й мыши опухоль быстро исчезла, у 2-й – 3-кратно увеличивалась до 72 мм³ от 9-го до 15-го дня (экспоненциальная фаза 6 дней). В период от 15-го до 30-го дня объем опухоли увеличился соответственно в 1,8 и 2,3 раза (стационарная фаза 15 дней). Максимальный объем опухоли на 30-е сут достиг 300 мм³ (табл. 2).

Анализ результатов показал, что инокуляция культуры клеток SKBR3 в стандартной прививочной дозе мышам *Balb/c nude* не приводит к 100%-ной прививаемости и вызывает образование медленно растущего ксенографта с длинной латентной, стационарной и короткой экспоненциальной фазами роста.

При 2-м пассаже взвесью опухоли подкожные уз-

лы одинакового объема 12 мм³ пальпировались у обеих мышей на 7-й день (латентная фаза). Затем от 7-го до 19-го дня опухоли увеличились в 5 раз и достигли на 15-й день объема 64 мм³, а на 19 день – 288 и 264 мм³ (экспоненциальная фаза 12 дней). Далее рост стабилизировался, и к 30-му дню увеличение объемов опухолей не превышало 2,6 и 1,8 раз, достигнув соответственно объемов 756 и 480 мм³ (стационарная фаза 11 дней).

Анализ результатов показал, что повторное пассирование опухоли взвесью клеток, полученных из подкожного ксенографта, приводит к 100%-ной прививаемости при более высокой скорости роста опухоли. При этом в сравнении с первым пассажем произошло укорочение латентной и стационарной фаз с 2-кратным увеличением длительности экспоненциальной фазы роста.

На 3-м пассаже 5 мышам трансплантировали по 60 мг опухолевой ткани 2-го пассажа. Достигнута 100%-ная прививаемость с выходом опухолей среднего объема 147 [114–180] мм³ к 6-му дню (латентный период). К 12-му дню объем опухолей возрос в 3,8 раз и продолжал расти в 2–4-кратном размере вплоть до 30-го дня опыта (экспоненциальная фаза 18 дней). В результате к концу наблюдения объем опухолей увеличился почти в 28 раз и достиг 4140 [2754–5526] мм³ (рис. 1).

Анализ результатов трансплантации показал, что 3-й пассаж вызвал образование стандартных подкожных ксенографтов SKBR3. При этом в сравнении со 2-м пассажем произошло дальнейшее укорочение латентной фазы с 3-кратным увеличением длительности экспоненциальной фазы без стационарной фазы роста.

Отработка модели ксенографта SKOV3 *in vivo*

При 1-м пассаже 9×10^6 клеток на мышь пальпируемый опухолевый узел SKOV3 появился на 8-й день (латентная фаза) у обеих взятых в опыт мышей (100%-ная прививаемость). Объемы опухолей у этих мышей были близки и составили соответственно 70 и 80 мм³. Затем в период от 12-го по 21-й день опухоли росли относительно медленно и достигли объема соответственно 120 и 135 мм³ и 216 и 288 мм³.

Таблица 1

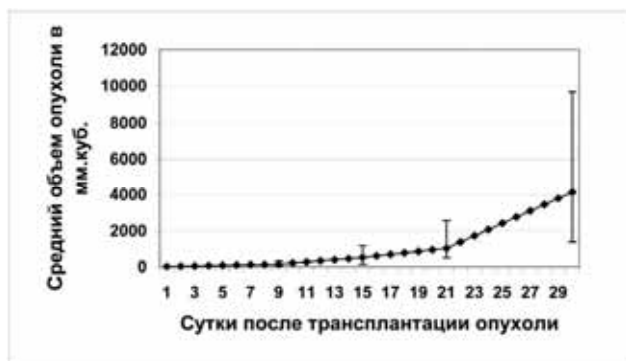
Критерии оценки экспрессии *HER2/neu* в ткани опухолей

Уровень экспрессии			
0	+	++	+++
Отсутствие окрашивания	Слабое окрашивание мембраны опухолевых клеток	Средняя и слабая интенсивность окрашивания полной мембраны более 10 % опухолевых клеток	Сильная степень окрашивания более 10 % опухолевых клеток
Отрицательная опухоль		Положительная опухоль	

Таблица 2

Кинетика роста 3 пассажей п/к ксенографтов SKBR3 у мышей-самок *Balb/c nude*

Инокулят, доза на мышь	Номер пассажа	Размеры опухоли на сутки после перевивки							
		1-е измерение*		2-е измерение		3-е измерение		4-е измерение	
		L×h×s (мм)	V (мм ³)	L×h×s (мм)	V (мм ³)	L×h×s (мм)	V (мм ³)	L×h×s (мм)	V (мм ³)
1×10 ⁷ клеток	1	2×1×1	2	Отс.	0	Отс.	0	Отс.	0
		4×3×2	24	6×4×3	72	8×4×4	128	10×6×5	300
60 мг	2	4×3×1	12	8×4×2	64	12×6×4	288	14×9×6	756
		4×3×1	12	8×4×2	64	11×6×4	264	12×8×5	480
60 мг	3	10×5×3	150	10×6×6	360	12×10×8	960	27×13×12	4212
		7×5×3	105	12×8×6	576	18×10×8	1440	18×20×15	5400
		10×6×3	180	10×8×7	560	12×10×8	960	19×18×14	4788
		7×6×4	168	14×7×5	490	15×7×5	525	24×12×10	2880
		8×5×3	120	13×8×6	624	14×10×9	1260	19×15×12	3420
Среднее значение		147 [114÷180]		522 [377÷667]		1029 [526÷1532]		4140 [2754÷5526]	
Vn/Vn-1		1,0		3,8		2,0		4,0	
*Сутки после перевивки: 1-е измерение – 6–9; 2-е измерение – 12–15; 3-е измерение – 19–21; 4-е измерение – 29–30									

Рис. 1. Динамика роста клеток рака молочной железы человека SKBR3 Her2+ под кожей у мышей-самок *Balb/c nude* (3-й пассаж)

Кратность увеличения объема не превышала 2,1 (стационарная фаза 9 дней). Лишь к 29-му дню объем опухоли значительно вырос до 960 и 1190 мм³ (экспоненциальная фаза 7 дней) (табл. 3).

При 2-м пассаже, выполненном по 60 мг опухолевой ткани на мышь, опухоли возникли у обеих мышей на 7-й день (латентная фаза), а их объемы существенно различались и составили 18 и 60 мм³ соответственно. Затем от 7-го до 15-го дней опухоли резко, в 7–24 раза увеличились в размерах и достигли объемов 432 и 440 мм³ (начало экспоненциальной фазы), а на 19–21-й дни – 1296 и 1344 мм³, прирост опухолей составил 3,0–3,1 раза (экспоненциальная фаза 15 дней). Далее рост от-

носительно стабилизировался и к 30-му дню их объемы составили 1960 и 2156 мм³, прирост опухолей соответственно 1,5–1,6 раз (стационарная фаза 9 дней).

3-й пассаж проведен взвесью клеток, полученных из опухолей 2-го пассажа. У 6 мышей, которым трансплантировали по 60 мг, опухоли достигли среднего объема 191 [97÷372] мм³ уже к 7-му дню (латентный период). К 13-му дню объем опухолей возрос в 3,6 раз и составил 696 [484÷908] мм³ (экспоненциальная фаза 6 дней). Затем рост опухолей снизился и в период от 15-го до 21-го дня составил соответственно 1536 [1166÷1906] мм³ (увеличение в 2,2 раза), а от 22-го по 30-й день – 3576 [2436÷4716] мм³ (увеличение в 2,3 раза) (стационарная фаза 15 дней) (табл. 3, рис. 2).

Анализ результатов показал, что культура клеток SKOV3 отличается 100%-ной прививаемостью и вызывает при всех видах трансплантации образование подкожных ксенографтов. При этом только при 2-м пассаже кинетика роста опухолей имела достаточно короткую латентную фазу и длительную фазу экспоненциального роста.

Полученные характеристики роста п/к ксенографтов SKBR3 и SKOV3 позволяют считать, что в течение 2 пассажей адаптация клеточных культур к росту *in vivo* завершена, опухоль достигает стандартных размеров в стандартные сроки и на 3-м пассаже пригодна для изучения противоопухолевой активности агентов длительного применения (герцептин и т.п.), т.к. длительность экспоненциальной фазы роста соответствует их терапевтической схеме.

Таблица 3

Кинетика роста п/к ксенографтов SKOV3 у мышей-самок *Balb/c nude*

Прививочная доза на мышшь	Номер пассажа	Размеры опухоли на сутки после перевивки							
		1-е измерение*		2-е измерение		3-е измерение		4-е измерение	
		L×h×s (мм)	Vcp (мм ³)	L×h×s (мм)	Vcp (мм ³)	L×h×s (мм)	Vcp (мм ³)	L×h×s (мм)	Vcp (мм ³)
7×10 ⁶ клеток	1	7×5×3	70	8×5×3	120	12×6×3	216	16×10×6	960
		8×5×2	80	9×5×3	135	12×6×4	288	17×10×7	1190
60 мг	2	3×3×2	18	9×8×6	432	12×12×9	1296	14×14×10	1960
		5×4×3	60	11×8×5	440	14×12×8	1344	14×14×11	2156
60 мг	3	9×6×5	270	19×8×6	912	20×11×9	1980	26×15×12	4680
		8×7×5	280	11×11×7	847	16×11×10	1760	24×14×14	4704
		8×6×4	192	11×9×7	693	16×10×10	1600	21×16×12	4032
		11×5×4	220	13×9×7	819	15×12×9	1620	21×15×12	3780
		8×4×3	84	14×6×5	420	16×10×7	1120	19×12×9	2052
		12×4×2	96	14×7×5	490	18×9×7	1134	23×12×8	2208
Среднее значение		191 [97÷372]		696 [484÷908]		1536 [1166÷1906]		3576 [2436÷4716]	
Vn/Vn-1		1,0		3,6		2,2		2,3	
*Сутки после перевивки:1-е измерение – 6–9; 2-е измерение – 12–15; 3-е измерение – 19–21; 4-е измерение – 29–30									

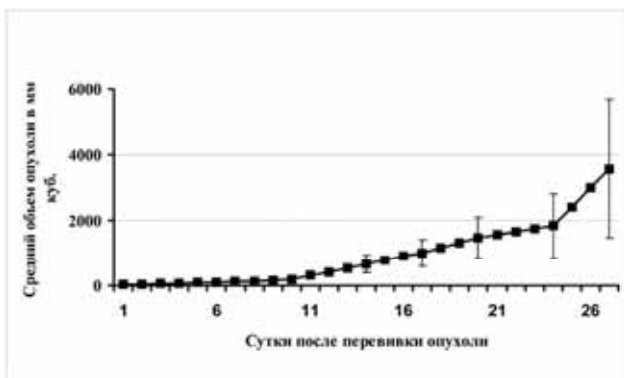


Рис. 2. Динамика роста клеток рака яичника человека SKOV3 Her2+ под кожей у мышей-самок *Balb/c nude* (3-й пассаж)

Определение экспрессии *HER2/neu* в подкожных ксенографтах SKOV3 и SKBR3 у мышей-самок *BALB/c nude*

Исследование показало, что на клетках подкожных ксенографтов SKOV3 и SKBR3 имеется гиперэкспрессия *HER2/neu* на «+++», что соответствует данным предварительного иммуноцитохимического анализа клеточных линий *in vitro*. В обеих опухолях наблюдается сильное окрашивание мембран клеток, некоторые из которых также имеют небольшое цитоплазматическое окрашивание. Прилегающие стромальные клетки не окрашены. Гиперэкспрессия

HER2/neu в опухолевых клетках сохраняется на протяжении всех 13 пассажей. В качестве отрицательного контроля при оценке экспрессии *HER2/neu* были использованы штаммы рака молочной железы РМЖ-3, РМЖ-4 и РМЖ-ч из банка ГУ РОНЦ (рис. 3).

ВЫВОДЫ

При инокуляции мышам-самкам *Balb/c nude* разведения ГУ РОНЦ:

1. Первый пассаж 1,0×10⁷ клеток линии рака молочной железы SKBR3 или 9,0×10⁶ клеток линии рака яичников SKOV3 с гиперэкспрессией *HER2/neu* не

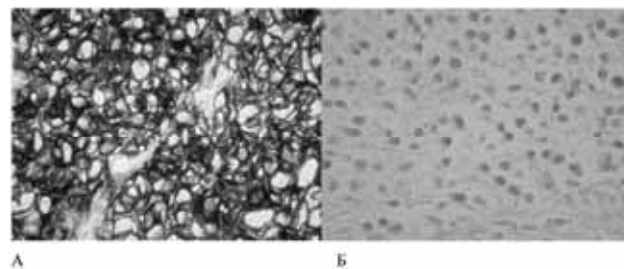


Рис. 3. Экспрессия *HER2/neu* на клетках ксенографтов опухолей человека у мышей *BALB/c nude*:

А – SKOV3 – гиперэкспрессия *HER2/neu*+++;

Б – РМЖ-4 – отсутствие гиперэкспрессии *HER2/neu*.

дает 100%-ной прививаемости и приводит к опухолевому росту с относительно длинной латентной фазой 8–9 дней, короткой экспоненциальной фазой 6–9 дней и стационарной фазой 7–15 дней.

2. Повторная инокуляция SKBR3 или SKOV3 взвесью клеток из опухолей 1-го пассажа по 60 мг/мышь приводит к 100%-ной прививаемости с образованием в течение 30 дней подкожных ксенографтов максимального объема 756–2156 мм³, характеризующихся относительно короткой латентной фазой 7 дней, относительно длинной экспоненциальной фазой 12–15 дней и стационарной фазой 9–11 дней.

3. Третий пассаж SKBR3 или SKOV3 взвесью клеток из опухолей 2-го пассажа по 60 мг/мышь приводит к 100%-ной прививаемости с образованием в течение 30 дней подкожных ксенографтов среднего объема 4140 и 3576 мм³, характеризующихся относительно короткой латентной фазой 6–7 дней, в случае SKOV 3 – короткой, а в случае SKBR3 – длинной экспоненциальной фазами 6 и 18 дней соответственно. Стационарная фаза в случае SKBR3 отсутствовала, а для SKOV3 составила 15 дней.

4. Подкожные ксенографты SKOV3 2-го пассажа и SKBR3 *Her2+* 3-го пассажа на мышах-самках *Balb/c nude* разведения ГУ РОНЦ по скорости роста (короткий латентный период и длинная экспоненциальная фаза) и размерам опухолевых узлов пригодны для экспериментальной оценки моноклональных антител, блокирующих рецептор *HER2/neu*.

Финансирование исследований обеспечено Научно-технической программой «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения онкологических и других заболеваний» на 2004–2006 гг., утвержденной Мэром г. Москвы Ю.М. Лужковым, Министром Промышленности, науки и технологий РФ А.Н. Дондуковым и Президентом РАН Ю.С. Осиповым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганьшина И.П., Личиницер М.Р. Герцептин в лечении рака молочной железы с гиперэкспрессией *HER2* // Фарматека. – Онкология ASCO. – 2006. – С. 7–9.

2. Имянитов Е.Н., Князев П.Г. Активация онкогена *ERBB-2* и прогноз течения рака молочной железы

у человека // Вопросы онкологии. – 1991. – Т. 37, № 5. – С. 527–34.

3. Имянитов Е.Н., Черница О.И., Иванова О.А. и др. Амплификация онкогена *ERBB-2(HER-2/NEU)* в опухолях молочной железы – прогностический маркер вероятности рецидива // Экспер. онкол. – 1992. – Т. 14, № 4. – С. 25–9.

4. Bangemann N., Burstein H., Harvey V. et al. Trastuzumab. A Review of its Use in the Treatment of Metastatic Breast Cancer Overexpressing *HER2* // Drugs. – 2002. – Vol. 62, suppl. 1. – P. 209–43.

5. Bangemann N., Kuhle A., Ebert A et al. Capecitabine combined with Trastuzumab in the therapy of intensively pretreated *HER2*-overexpressing metastatic breast cancer [abstract] // Ann. Oncol. – 2000. – Vol. 11, suppl. 1. – № 4. – P. 143.

6. Fogh J. et al. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice // J. Natl. Cancer Inst. – 1997. – Vol. 59. – P. 221–6.

7. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying *ErbB2/HER2* action in breast cancer // Oncogene. – 2000. – Vol. 19. – P. 6102–14.

8. Harries M., Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin) // Endocrine-Related Cancer. – 2002. – Vol. 9. – P. 75–85.

9. Jahanzeb M., Mortimer J.E., Yunus F. et al. Phase II Trial of Weekly Vinorelbine and Trastuzumab as First-Line Therapy in Patients with *HER2+* Metastatic Breast Cancer // The Oncologist. – 2002. – Vol. 7, No 5. – P. 410–7.

10. Miller K.D., Sisk J., Ansari R. et al. Gemcitabine, paclitaxel, and trastuzumab in metastatic breast cancer // Oncology. – 2001. – Vol. 15(2), suppl. 3. – P. 38–40.

11. Morimoto H. et al. Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and diphtheria toxin mediated cytotoxicity in sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines // J. Immunol. – 1991. – Vol. 147. – P. 2609–16.

12. Slamon D.J. Update on Taxoter/Platinum/Herceptin combinations // Satellite meeting of the 24th San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, TX, USA, 2001.

13. Trempe G.L. Human breast cancer in culture // Resent Results Cancer Res. – 1976. – Vol. 57. – P. 33–41.

14. Yu D., Hung M.C. Overexpression of *ErbB2* in cancer and *ErbB2*-targeting strategies // Oncogene. – 2000. – Vol. 19. – P. 6115–21.

Поступила 20.11.2006.

УДК 616-006.81-033.2:615.371:611.018.83

*I.N. Mikhaylova¹, N.N. Petenko¹, G.Z. Chkadua¹, L.Y. Vishnyakova¹, E.V. Ogorodnikova¹,
G.S. Allahverdyan¹, E.A. Cheremushkin¹, K.S. Titov¹, S.A. Hatirev¹, T.K. Haratishvili¹,
K.A. Parsunkova², M.D. Aliev¹, A.Yu. Baryshnikov¹, L.V. Demidov¹*

DENDRITIC CELL VACCINE THERAPY OF ADVANCED MELANOMA: I/II PHASE CLINICAL TRIAL

¹*N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow*

²*«Intermedbiophyschem», Moscow*

ABSTRACT

We conducted the clinical trial using autologous dendritic cell based vaccine for melanoma treatment. Clinical effectiveness was evaluated in advanced melanoma patients and in patients after radical surgery.

Key words: vaccine, dendritic cell, melanoma, tumor antigens, immune system.

*И.Н. Михайлова¹, Н.Н. Петенко¹, Г.З. Чкадуа¹, Л.Ю. Вишнякова¹, Е.В. Огородникова¹,
Г.С. Аллахвердян¹, Е.А. Черемушкин¹, К.С. Титов¹, С.А. Хатырев¹, Т.К. Харатишвили¹,
К.А. Парсункова², М.Д. Алиев¹, А.Ю. Барышников¹, Л.В. Демидов¹*

ВАКЦИНОТЕРАПИЯ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК: КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ I/II ФАЗЫ

¹*ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

²*ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва*

РЕЗЮМЕ

В настоящей статье представлены результаты клинического исследования по вакцинотерапии меланомы с использованием дендритных клеток, целью которого является изучение влияния вакцинотерапии на клиническое течение диссеминированной меланомы как в терапевтическом режиме, так и после радикального хирургического вмешательства.

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

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия так и не было достигнуто значительного улучшения выживаемости больных меланомой на этапе реализации регионарных и отдаленных метастазов. Несмотря на последние достижения медицины, основные принципы лечения меланомы за последние десятилетия не претерпели значительных изменений, стандартными на сегодняшний день остаются хирургическое вмешательство и химиотерапия, эффективность которой не превышает 20 %. При этом болезнь, перешагнувшая рубеж регионарных лимфатических узлов, снижает показатели 5-летней выживаемости до 5 %.

Меланома является иммуногенной опухолью, т.е. способной индуцировать Т-клеточный противоопухолевый иммунитет *in vivo*. Иммунная реакция развивается против специфических или опухолеассоциированных антигенов (ОАА), экспрессируемых на по-

верхности опухолевой клетки. Существует множество свидетельств о корреляции между регрессией меланомы и активацией противоопухолевых Т-лимфоцитов, которые обнаруживаются в периферической крови и удаленных регрессирующих метастазах на фоне иммунотерапии. В связи с этим в последнее время активно исследуются методы специфической иммунотерапии меланомы, в частности, вакцинотерапия с использованием дендритных клеток (ДК), целью которой является индукция противоопухолевого иммунитета *in vivo*.

Цель исследования – изучить токсичность и переносимость вакцины на основе аутологичных дендритных клеток, а также оценить клиническую эффективность в лечении метастатической меланомы как в терапевтическом режиме, так и после радикального хирургического вмешательства, т.е. адъювантно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), нагруженных опухолевым лизатом *in vitro*. Для приготовления опухолевого лизата использовался аутологичный операционный материал опухолевого происхождения. ДК получали из мононуклеаров периферической крови (МПК) пациентов, которые культивировали в присутствии цитокинов ГМ-КСФ и ИЛ-4. Созревание ДК индуцировали с использованием ФНО- α , ПГ_{E2} (методика разработана в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН) [2]. Применялись зрелые ДК следующего фенотипа: CD83⁺, CD80⁺, CD54⁺, CD86⁺, HLA-DR⁺.

ДК вводились пациентам внутривенно в несколько точек (от 2 до 10) в непосредственной близости от регионарных лимфатических коллекторов. Однократная доза введения клеток составляла от 1,0 до 5,0 $\times$ 10⁶ клеток, интервалы между вакцинациями составляли 2–6 нед, кратность введения – до прогрессирования заболевания.

Токсические побочные эффекты оценивались по шкале токсичности (СТСЭ v.3). Объективный клинический ответ в терапевтической группе оценивался согласно критериям RECIST, в профилактической группе оценивалась безрецидивная выживаемость, для обеих групп – общая выживаемость. Анализ выживаемости пациентов проводился по методу Kaplan-Meier.

С 2003 по 2006 гг. в исследование включались 42 пациента с метастатической меланомой в возрасте от 26 до 82 лет (в среднем 54 года), мужчины/женщины = 24/18.

Больные были разделены на 2 клинические группы: 1-я – пациенты с регионарными и/или отдаленными метастазами, получающие вакцину в терапевтическом режиме в виде монотерапии, при этом изолированное поражение лимфоузлов отмечалось у 2 пациентов, отдаленные метастазы – у 15, всего включено 17 пациентов; 2-я группа – пациенты с той же распространенностью процесса после радикального хирургического вмешательства, получающие лечение в профилактическом режиме, причем изолированные регионарные метастазы обнаруживались у 10 пациентов, отдаленные метастазы (+/– поражение регионарных лимфоузлов) – у 15, всего включено 25 пациентов.

Лечение проводилось амбулаторно, включало вводную фазу, которая состояла из первых 4 вакцинаций, проводимых каждые 2 нед, и поддерживающую фазу с введением вакцины каждые 2–4 нед; при стабильном состоянии пациентов в ходе длительного лечения интервал между введением ДК увеличивался до 6 нед. В таком режиме терапия продолжалась до объективного прогрессирования заболевания. В отдельных случаях у больных терапевтической группы при категорическом отказе от химиотерапии введение вакцины продолжалось и после прогрессирования заболевания. В профилактической группе после прогрессирования заболевания на фоне иммунотерапии проводилось повторное хирургиче-

ское иссечение метастазов меланомы, и при согласии пациента продолжалась вакциноterapia дендритными клетками, активация которых проводилась при использовании аутологичного лизата из свежего опухолевого материала, полученного в результате последней операции.

Критерии включения в исследование: морфологическая верификация диагноза, не менее 4 нед от окончания предшествующей терапии, общее состояние больного по шкале ECOG не более 2, возраст от 18 лет и старше, отсутствие аутоиммунных заболеваний, письменное согласие на участие в исследовании.

Большинству пациентов (75 %) до начала вакцинотерапии проводилось интенсивное лекарственное лечение (химиотерапия, биохимиотерапия, иммунотерапия), на фоне которого отмечено прогрессирование заболевания. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1 и 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценивались клинические характеристики пациентов, завершивших вводную фазу лечения, включающую первые 4 вакцинации. К настоящему времени 33 пациента (79 %) получили 4 и более вакцинаций. В терапевтической группе $n=13$, всего проведено 210 вакцинаций (от 4 до 21 на пациента, в среднем 10,5 введений); в профилактической группе $n=20$, всего проведено 205 вакцинаций (от 4 до 38 на пациента, в среднем 15,8 введений).

Токсичность лечения

Переносимость лечения хорошая. Выраженных побочных эффектов вакцинотерапии, требующих симптоматической терапии или прекращения лечения, не отмечено (табл. 3). Проводимая терапия не оказывала негативного влияния на качество жизни пациентов, большинство вели активный образ жизни, пациенты профилактической группы во время лечения в полной мере сохраняли трудоспособность.

Клиническая эффективность

Терапевтическая группа: объективная клиническая эффективность отмечена в 15,4 % случаев ($n=2$), 1 ПР (пациент ЧД28), 1 ЧР (пациент НА47). Следует отметить, что пациенту ЧД28 за 4 нед до начала вакцинотерапии проведены 2 курса химиотерапии, поэтому невозможно определить, чем конкретно обусловлена клиническая эффективность, однако ранее после 4-кратного хирургического вмешательства и 2 линий профилактической химиотерапии по поводу регионарных и мягкотканых метастазов безрецидивный промежуток не превышал 12 мес, тогда как на фоне вакцинотерапии прогрессирования заболевания не было уже 20+ мес. В 5 случаях отмечена СЗ (38,5 %) длительностью от 2 и более мес (см табл. 1). 1-летняя выживаемость составила 42,5 %, медиана выживаемости – 9,5 мес. (рис. 1). К настоящему моменту живы 5 пациентов, из них 2 продолжают вакцинотерапию. Время наблюдения от 4 до 39+ мес.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов терапевтической группы, завершивших вводную фазу
(≥ 4 вакцинаций), n=13

Код пациента	Проявления болезни до начала вакцинотерапии (метастазы)	Предшествующая терапия					Количество вакцина- ций	RECIST	Выживаемость, мес
		Х	ХТ	БХТ	ИТ	ЛТ			
КА46	В мягкие ткани передней грудной стенки (1,7 см; 4,5 см), подмышечной области (3,7 см), в мягкие ткани передней брюшной стенки (1,1 см), л/у ворот печени (3,8 см)	++	++	–	++	–	4	ПЗ	4
ПТ82	В мягкие ткани правого плеча (2,2 см)	++	–	–	–	–	10	СЗ	10
ОН51	Диффузное инфильтративное поражение обеих молочных желез, подмышечный л/у справа (2,8 см)	+++	–	+	–	–	21	СЗ	17
ГМ76	В мягкие ткани бедра (от 0,7 до 1,9 см), голени (1,0 см; 1,4 см; 0,4 см), подколенной ямки (0,8 см; 0,5 см)	++, КД	–	+	+	+	8	ПЗ	4
АВ40	В парааортальные л/у (4,2 см; 2,8 см; 2,4 см), паховые л/у справа (1,5 см), подвздошные л/у слева (2,8 см; 2,9 см); бедренные л/у слева, в мягкие ткани п/о рубца (от 0,5 см до 1,5 см, 2 л/у по 2,0 см и 2,4 см)	++	++	+	++	+	7	ПЗ	4
СТ39	В мягкие ткани левой нижней конечности (n=15, от 0,5 см до 2,8 см), печень (1,6 см), правый яичник (14 см), по брюшине (7,5 см)	+++ , ЛИ	+	+	–	–	12	ПЗ	6
КТ47	В мягкие ткани передней брюшной стенки (1,9 см; 1,7 см; 1,6 см, 0,3 см), подмышечные л/у слева (2,1 по 1,8 см), пахово-подвздошные л/у справа (2,8 см; 3,6 см; 3,8 см; 2,8 см), наружные подвздошные л/у слева (2,6 см; 1,2 см)	+++	–	+	–	–	17	СЗ	9
КТ53	В паховые л/у справа – 7,4 см	++	++	+	–	–	5	ПЗ	3
АИ81	В мягкие ткани туловища, конечностей, подмышечные л/у справа (2,4 см; 2 см, 1,5 см; 3,6 см), подвздошные л/у слева (2,8 см), надпочечник справа (4 см), паховый л/у слева (1 см)	+++	–	+	++	–	22	СЗ	39+
ЛЛ62	В паховый л/у слева (4,5 см)	++	+	+	++	–	38+	СЗ	28+
ЧД28	В подвздошные л/у слева (3,2 см; 2,6 см), бедренные л/у слева (0,8 см), в мягкие ткани в/3 левого бедра (0,7 см)	++++	++	–	+	–	27+	ПО (20+ мес.)	24+
ЗА47	В подмышечные л/у справа, л/у средостения	++	–	–	–	–	4	ПЗ	16+
НА47	В л/у шеи (2,8 см; 3,7 см), надключичные л/у слева (3,8 см)	+	–	–	–	–	30	ЧО (4 мес.)	31+

Х – хирургическое лечение, ХТ – химиотерапия, БХТ – биохимиотерапия, ИТ – иммунотерапия, ЛТ – лучевая терапия, КД – криодеструкция, ЛИ – лазерное иссечение, ВДП – время до прогрессирования, СЗ – стабилизация заболевания, ПО – полный ответ, ЧО – частичный ответ, ПЗ – прогрессирование заболевания, п/о – послеоперационный, л/у – лимфоузлы.

Таблица 2

Клиническая характеристика пациентов профилактической группы, завершивших вводную фазу (≥ 4 вакцинаций), n=20

Код пациента	Проявление болезни до начала вакцинации (метастазы)	Предшествующая терапия					Количество вакцинаций	ВДП, мес.	Выживаемость, мес.
		Х	ХТ	БХТ	ИТ	ЛТ			
A43	В бедренные л/у слева (5,6 см)	+	-	-	-	-	6	5	10+
БЛ62	В мягкие ткани спины, подмышечные л/у слева	+	-	-	-	+	15	4	8
КЮ67	Подмышечные л/у справа (1,8 см; 1,3 см; 0,8 см)	++	+	-	-	-	21+	9	20+
ТН56	В мягкие ткани п/о рубца	+	++	+	-	-	4	2	3
ШЛ53	В мягкие ткани грудной стенки (1,2 см)	+	+	-	-	-	15+	без ПЗ	17+
ЮМ59	В верхнюю долю правого легкого (1,4 см)	-	-	-	-	-	14	17	17+
БГ55	В мягкие ткани бедра справа	+	+	-	+	-	6	4	11
ЖВ60	В мягкие ткани бедра справа (1,5 см)	+	+	-	-	-	14+	без ПЗ	17+
БЗ37	Подвздошные л/у слева (6,0 см, 3,8 см)	+	+	-	-	-	17+	без ПЗ	16+
БН57	В мягкие ткани п/о рубца (1,1 см)	+	-	-	+	-	16+	без ПЗ	16+
КЕ41	В мягкие ткани туловища, плеча слева, подмышечные л/у слева, паховые л/у справа; ПО после ХТ	+	-	-	+	-	13+	без ПЗ	15+
ОГ45	В мягкие ткани передней грудной стенки (2 см)	+++	-	-	+	-	7	4	15+
ТО26	В мягкие ткани грудной стенки, ягодичной области	+	+	-	-	-	4	4	14+
КМ39	В мягкие ткани передней брюшной стенки (8,9 см), нижнюю долю левого легкого (2,5 см)	++	-	-	+	-	11+	без ПЗ	12+
ЦЕ48	В паховые л/у слева (1,6 см)	+	-	-	-	-	11	10	12+
ЩЕ45	В паховые л/у слева (4,4 см, 3,1 см)	+	-	-	-	-	5	3,5	11+
ОМ43	В паховые л/у слева (3,2 см)	+	-	-	+	-	11+	без ПЗ	11+
ЕД29	В мягкие ткани (3 см)	+++++	+	-	-	-	7+	без ПЗ	8+
ЩВ48	В подмышечные л/у слева (4,3 см)	+++	+	-	+	-	9+	без ПЗ	10+
БА27	В паховые л/у справа (2,2 см)	+	-	-	-	-	4	2	8+

Х – хирургическое лечение, ХТ – химиотерапия, БХТ – биохимиотерапия, ИТ – иммунотерапия, ЛТ – лучевая терапия, КД – криодеструкция, ЛИ – лазерное иссечение, ВДП – время до прогрессирования, СЗ – стабилизация заболевания, ПО – полный ответ, ЧО – частичный ответ, ПЗ – прогрессирование заболевания, п/о – послеоперационный, л/у – лимфоузлы.

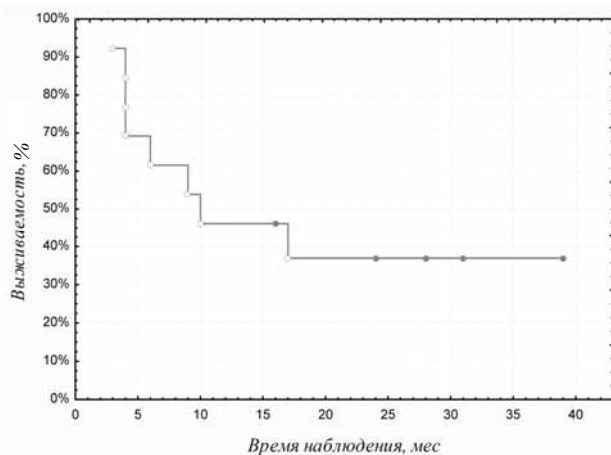


Рис. 1. Общая выживаемость больных терапевтической группы, n=13

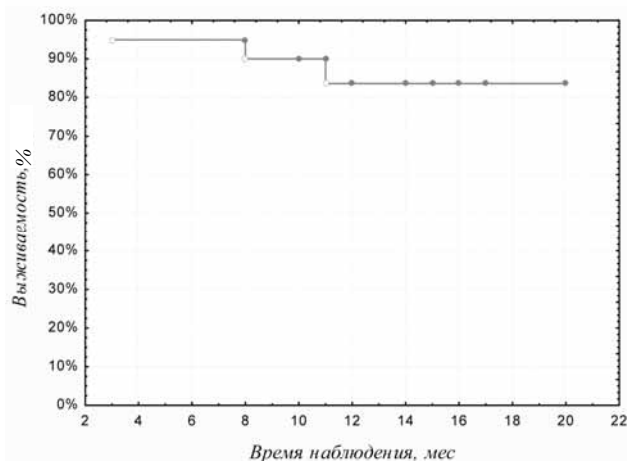


Рис. 2. Общая выживаемость больных профилактической группы, n=20

Таблица 3

Частота и степень выраженности побочных реакций

Побочные эффекты		Частота, %	Степень выраженности СТС
Общие	Повышение Т°С тела до субфебрильных цифр	25	1
	Слабость	17	
	Ломота в костях и суставах	12	
Локальные	Гиперемия	85	
	Зуд	63	
	Болезненность	16	

Профилактическая группа: время до прогрессирования (медиана) составляет 10 мес, без признаков прогрессирования заболевания к настоящему времени 45 % больных (см табл. 2). 1-летняя выживаемость – 84 %. При медиане наблюдения 12 мес (от 3 до 20+) медиана выживаемости не достигнута (рис. 2). К настоящему времени 10 пациентов продолжают получать вакцинотерапию.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вакцинотерапия меланомы с использованием ДК хорошо переносима, не обладает выраженными побочными эффектами. Данный метод направлен на индукцию противоопухолевого иммунитета *in vivo*, однако у пациентов с большой опухолевой нагрузкой отмечается выраженная локальная (в опухолевом очаге) и общая супрессия иммунной системы, в связи с чем некомпетентность иммунного ответа, усугубляемая генетической нестабильностью опухоли, обуславливает стремительное распространение и рост метастазов, которые реализуются быстрее противоопухолевой иммунной реакции. Кроме того, проводимое

раннее химио- или биохимиотерапевтическое лечение оказывает значительное угнетающее воздействие на костный мозг, снижая образование эффекторов специфического иммунного ответа и качественно нарушая их функциональную активность. Перечисленные факторы обуславливают пока невысокую клиническую эффективность метода и неблагоприятный прогноз течения диссеминированного злокачественного заболевания.

Большинство пациентов настоящего клинического исследования отвечают перечисленным критериям неблагоприятного прогноза, особенно в терапевтической группе (см. табл. 1 и 2), поэтому наблюдаемая клиническая эффективность (15,4 %) отмечается как раз у пациентов с небольшой опухолевой нагрузкой и неинтенсивной предшествующей лекарственной терапией.

М. О'Rourke в клиническом исследовании 2003 г. предпринял попытку обнаружить корреляцию клинической эффективности ДК вакцины и распространенности опухоли при лечении диссеминированной меланомы. В качестве прогностического критерия исследовался сывороточный S100b, уровень которого,

как известно, повышается при увеличении стадии заболевания и коррелирует с размером метастазов меланомы. М. O'Rourke выявил пороговое значение сывороточного маркера, определяющее эффективность проводимой вакцинотерапии. При анализе выживаемости по методу Kaplan-Meier пациентов, заболевание которых прогрессировало на фоне лечения, периферические и висцеральные метастазы имели более крупные размеры, и уровень S100b превышал пороговое значение по сравнению с пациентами, ответившими на лечение ($\log \text{rank } p < 0,001$).

Учитывая, что самостоятельные циторедуктивные хирургические вмешательства при меланоме III и даже IV стадии способствуют улучшению общей выживаемости, комбинация радикального/циторедуктивного хирургического подхода с последующей ДК вакцинотерапией в лечении метастатической меланомы представляется более оптимальной.

1-летняя выживаемость в профилактической группе с учетом отдаленного метастазирования у 75 % больных (отдаленные лимфоузлы, мягкие ткани, легкие) составила 84 %. Представляет интерес изучение 5-летней выживаемости при сохранении текущего режима вакцинотерапии.

Мы считаем целесообразным дальнейшее исследование ДК вакцинотерапии в лечении меланомы. Наиболее важными задачами для дополнительного изучения являются применение ДК вакцины в профилактическом и терапевтическом режиме пациентам с минимальными проявлениями заболевания, по-прежнему актуальной остается проблема оптимизации ДК вакцины и использования иммунологических адъювантов.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Демидов Л.В. Хирургическая «погоня» за метастазами меланомы // V Российская онкологическая конференция, 27-29 ноября 2003, Москва.
2. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н. и др. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // РБЖ. – 2002. – Т. 1, №3. – 56–9.
3. Hauschild A., Michaelson J. et al. Prognostic significance of serum S100B detection compared with routine blood parameters in advanced metastatic melanoma patients // Melanoma Res. – 1999. – 9. – P. 155–61.
4. Holland-Frei. Cancer Medicine 6th edition (April 2003); by Donald W., Kufe M. et al: 3286–4527.
5. Michael G.E. O'Rourke, Johnson M. et al. Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine // Cancer Immunol Immunother. – 2003. – 52. – P. 387–95.
6. Vries I., Bernsen M. et al. Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome // J. Clin. Oncol. – 2005. – Aug 20; 23(24). – P. 5779–87.

Поступила 11.12.2006.

УДК 612.014.44:577.352.2:616-006

*D.G. Gurevich^{1,2}, I.G. Meerovich¹, G.A. Meerovich³, S.I. Vorobyov⁴,
V.G. Pevgov⁵, Z.S. Smirnova¹, N.A. Oborotova¹, E.A. Lukyanets⁶, A.Yu. Baryshnikov¹*

INFLUENCE OF VESICLE SIZE DISTRIBUTION ON LEVEL AND SELECTIVITY OF ACCUMULATION OF LIPOSOMAL PHOTOSENSITIZER TIOSENS IN TUMOR

¹*N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow*

²*I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow*

³*A.M. Prokhorov General Physics Institute of RAS, Moscow*

⁴*M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow*

⁵*M.V. Khrunichev State Scientific & Production Space Center, Moscow*

⁶*State Research Center «NIOPIK», Moscow*

ABSTRACT

. Current work was performed to estimate the influence of liposomal size distribution on the level and selectivity of accumulation of long-wavelength photosensitizer Tiosens (liposomal form of aluminium hydroxide phenylthiophthalocyanine) in tumor. Tiosens liposome dispersions were prepared using classic Bangham procedure. Particle size was reduced and unified using Avanti Mini-Extruder equipped with Nucleopore membranes and high-pressure homogenizer «Donor-1». Liposomal size distribution was determined by means of laser correlation spectroscopy. Dynamics and selectivity of Tiosens accumulation in Erlich tumor were measured *in vivo* using fluorescence spectroscopy. It was shown that level and selectivity of accumulation of liposome-encapsulated drug is determined mostly by content of small-sized fractions, while fractions of larger size are quickly cleared from blood by RES and not contribute in photosensitizer accumulation.

Key words: selectivity of accumulation, photosensitizer, liposomes, tumor neovascularization.

*Д.Г. Гуревич^{1,2}, И.Г. Меерович¹, Г.А. Меерович³, С.И. Воробьев⁴, В.Г. Певгов⁵,
З.С. Смирнова¹, Н.А. Оборотова¹, Е.А. Лукьянец⁶, А.Ю. Барышников¹*

ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРОВ ЛИПОСОМ НА УРОВЕНЬ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ ТИОСЕНСА В ОПУХОЛИ

¹*НИИ ЭДнТО ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН,*

²*ММА им. И.М. Сеченова,*

³*ЦНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН,*

⁴*МИТХТ им. М.В. Ломоносова,*

⁵*ГКНПЦ им. М.В.Хруничева,*

⁶*ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»*

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе исследовалось влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления в опухоли длинноволнового фотосенсибилизатора тиосенс (липосомальной формы фенилтиофталоцианина алюминия гидроксида). Липосомальную дисперсию тиосенса готовили методом Бенгема. Уменьшение размеров липосом проводили на ручном экструдере Avanti Mini-Extruder и на экструдере высокого давления «Донор-1». Размеры липосом определяли методом лазерной корреляционной спектроскопии. Уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли Эрлиха оценивали *in vivo* лазерно-флуоресцентным методом. В результате эксперимента показано, что накопление липосомального препарата определяется в основном фракциями с более мелкими липосомами. Крупные липосомы быстрее выводятся из плазмы крови за счет поглощения ретикулоэндотелиальной системой и не вносят существенного вклада в накопление фотосенсибилизатора.

Ключевые слова: селективность накопления, фотосенсибилизатор, липосомы, неоваскуляризация опухолей.

ВВЕДЕНИЕ

Одними из основных факторов, определяющих эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) и флюоресцентной диагностики, являются уровень и селективность накопления фотосенсибилизаторов (ФС) в опухоли [3]. Эти характеристики также определяют вероятность поражения здоровых тканей и органов, прилегающих к патологическому очагу, и кожную фототоксичность ФС. С другой стороны, они в значительной мере влияют на выбор дозы вводимого препарата и лазерного облучения.

В последние годы существенно возрос интерес к наноструктурным системам доставки препаратов [8]. При разработках ФС наиболее активно проводятся работы по созданию липосомальных и мицеллярных лекарственных форм ФС.

В литературе подробно обсуждаются механизмы селективного накопления наноструктурных ФС в опухоли. Одним из возможных механизмов их накопления считают проникновение нанопрепаратов через дефекты новообразованных сосудов опухолей [6; 7; 9; 10]. Эти дефекты имеют размеры от сотен нанометров до нескольких микрон. Например, для карциномы молочной железы мышей МСa-IV характерно наличие дефектов диаметром 1200–2000 нм, для опухоли молочной железы Shionogi – 200–380 нм, для карциномы толстой кишки LS 174T – 400–600 нм [6]. На рис. 1 приведена микрофотография дефектов сосудов карциномы толстой кишки LS 174T1.

Экспериментальное подтверждение механизма проникновения липосом в опухолевую ткань было получено в работе О. Ishida et al. [7]. На рис. 2 представлена микрофотография, полученная методом растровой электронной микроскопии, где отчетливо наблюдается повышенное накопление липосом вблизи дефекта в сосуде опухоли.

Естественно ожидать, что уровень и селективность накопления ФС в опухоли будет зависеть от диаметра наночастиц в препарате и его соотношения с размерами дефектов сосудов. В ряде работ изучалось влияние размеров липосом на уровень накопления препарата в опухолях [4; 5; 7]. В этих работах было показано, что наиболее высокий уровень накопления препаратов характерен для наночастиц размером от 90 [4] до 160–220 нм [5]. Кроме того, уровень накопления зависит и от других факторов, в частности, от типа опухоли и характерных для ее сосудов дефектов. В связи с этим для оптимизации методических и технологических подходов при изучении новых наноструктурных противоопухолевых препаратов, в частности, липосомальных ФС, представляется важным экспериментально оценить на выбранных моделях опухолей влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления ФС.

Цель настоящей работы – исследовать влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления в опухоли длинноволнового фотосенсибилизатора тиосенс [1] (липосомальной формы фенилтиофталоцианина алюминия гидроксида $[(\text{PhS})_4\text{PcAlOH}]$).

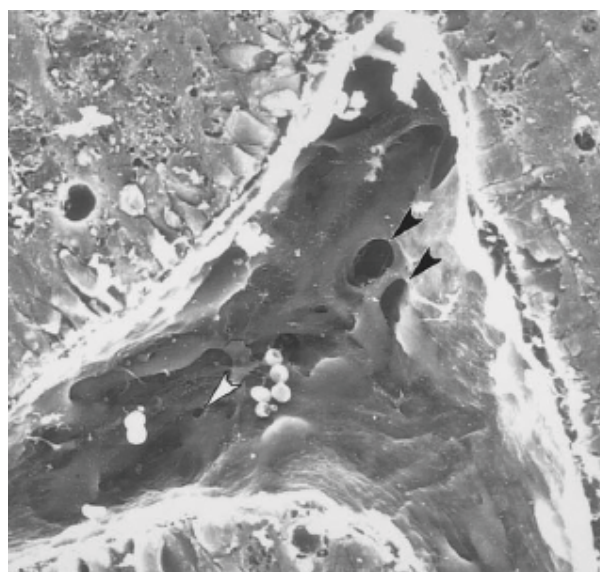


Рис. 1. Дефекты выстилающего слоя сосудов человеческой карциномы толстой кишки LS 174T1:

Поры в стенке сосуда обозначены стрелкам. Микрофотография с растрового электронного микроскопа, увеличение в 360 раз [6].

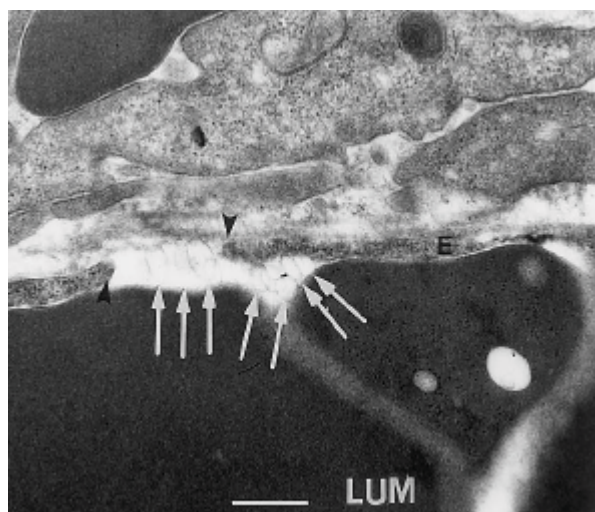


Рис. 2. Проникновение липосом через пору в сосуде опухоли:

Черными стрелками обозначен дефект в стенке сосуда, белыми – скопление липосом. Микрофотография с растрового электронного микроскопа, увеличение в 14 000 раз [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Липосомы на основе лецитина E PC S (Lipoid, Германия), холестерина (Sigma, Япония), mPEG-2000-фосфатидилэтаноламина (Lipoid, Германия) и субстанции $[(\text{PhS})_4\text{PcAlOH}]$ (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК») готовили методом Бенгема. Субстанцию ФС вводили в липидный бислой. Молярное соотношение липидов

составило 17:4:1, соотношение «общий липид:фталоцианин» – 265:1.

Уменьшение размеров липосом обеспечивалось экструзионным методом: на экструдере высокого давления «Донор-1» с твердосплавной фильерой в течение 30 мин при давлении 500 атмосфер и методом ручной экструзии через мембраны Nucleopore (Whatman, США) с диаметром пор 0,2 мкм на экструдере Avanti Mini-Extruder (Avanti Lipids, США).

Размеры липосом определяли методом лазерной корреляционной спектроскопии.

Уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли оценивали *in vivo* лазерно-флюоресцентным методом с использованием волоконного спектроанализатора «ЛЭСА-01-Биоспек» («Биоспек», Россия). Уровень накопления ФС выражался в условных единицах (усл. ед.) и оценивался по интегральной интенсивности его флюоресценции путем сравнения ее с интенсивностью флюоресценции фталоцианин-содержащего полимерного образца с известной концентрацией фталоцианина, сопоставимой с терапевтической концентрацией, и оптическими характеристиками рассеивания, близкими к свойствам человеческих тканей. Селективность накопления тиосенса рассчитывалась как отношение интенсивности флюоресценции препарата в опухоли и в здоровой ткани и выражалась в виде индекса селективности [2]. Исследования проводились на мышах F₁ [C57Bl/6×CBA] с опухолью Эрлиха, перевитой внутримышечно в голень правой задней лапы. Липосомальную дисперсию вводили в хвостовую вену в дозах 4 мг/кг и 6 мг/кг массы тела животных на 6-й день после перевивки опухоли.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе сравнивались уровни накопления липосомальной дисперсии тиосенса с липосомами различных размеров.

После измельчения липосомальной дисперсии на экструдере «Avanti» получили 2 образца с размером липосом 425 ± 25 нм и 105 ± 5 нм. Препарат вводили внутривенно в дозе 4 мг/кг массы тела животного, измерения проводились через 3 ч после введения. Как видно из рис. 3, липосомы небольшого размера (105 ± 5 нм) обеспечивают значительные уровни (2,15 усл. ед.) и селективность накопления (2,4) тиосенса в опухоли. При больших размерах липосом (425 ± 25 нм) селективного накопления фотосенсибилизатора в опухоли не происходит: уровень накопления ФС в нормальной ткани (1 усл. ед.) превышает уровень накопления в опухоли (0,8 усл. ед.)

Для другого опыта приготовили 2 липосомальные дисперсии. В дисперсии № 1, измельченной на промышленном экструдере «Донор-1», основной размер липосом составил 76 нм. В дисперсии № 2, полученной при помощи ручного экструдера «Avanti», размер липосом составил 446 нм и 183 нм (соотношение 1:3). Обе липосомальные дисперсии тиосенса вводили животным внутривенно в дозе 6 мг/кг массы тела мышей.

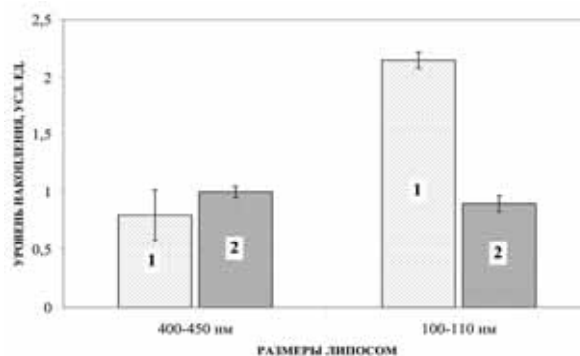


Рис. 3. Уровень накопления тиосенса в опухоли Эрлиха (1) и нормальной ткани (2) через 3 ч после внутривенного введения его липосомальной формы в дозе 4 мг/кг веса

На рис. 4, А и Б, показан уровень накопления тиосенса в опухоли (1) и нормальной ткани (2) для мелких (дисперсия № 1) и крупных (дисперсия № 2) липосом соответственно.

Как видно из рис. 4, А, уровень накопления тиосенса при введении дисперсии № 1 растет в течение 3 ч после введения, интенсивность флюоресценции достигает максимального значения 3,2 усл. ед. Далее интенсивность флюоресценции постепенно снижается и к 168-му часу составляет 1,4 усл. ед. Уровень накопления тиосенса в нормальной ткани через 3 ч составляет 0,9 усл. ед., через 168 ч – 0,3 усл. ед.

Уровень накопления тиосенса при введении липосомальной дисперсии № 2 (рис. 4, Б) также растет в течение 3 ч. В опухоли через 3 ч после введения уровень накопления составил 1,1 усл. ед., через 168 ч – 0,7 усл. ед., в нормальной ткани – 0,4 усл. ед. через 3 ч после введения и 0,1 усл. ед. через 168 ч после введения (см. таблицу).

Таким образом, уровень накопления тиосенса при введении дисперсии № 1 через 3 ч оказывается почти в 3 раза выше, чем при введении дисперсии № 2. Это позволяет сделать предварительный вывод о том, что при введении липосомальных дисперсий, содержащих липосомы разных размеров, накопление липосомального препарата определяется в основном фракциями с более мелкими липосомами.

На рис. 5 представлен индекс селективности тиосенса при введении липосомальных дисперсий № 1 (А) и № 2 (Б).

Селективность накопления тиосенса через 3 ч после введения дисперсии № 1 составляет 3,5, а дисперсии № 2 – 2,7. Через 96 ч селективность накопления обеих дисперсий примерно равна 6,5.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты показывают, что высокий уровень и селективность накопления липосомальной дисперсии тиосенса определяются в основном количественным содержанием мелких липосом. По нашим оценкам, оптимальный размер составляет около 100 нм. Более крупные липосомы менее эффективно проникают

Уровень накопления липосомальных дисперсий тиосенса

Дисперсия	Уровень накопления, усл. ед.			
	Через 3 ч после введения		Через 168 ч после введения	
	Опухоль	Нормальная ткань	Опухоль	Нормальная ткань
№1	3,2	0,9	1,4	0,3
№2	1,1	0,4	0,7	0,1

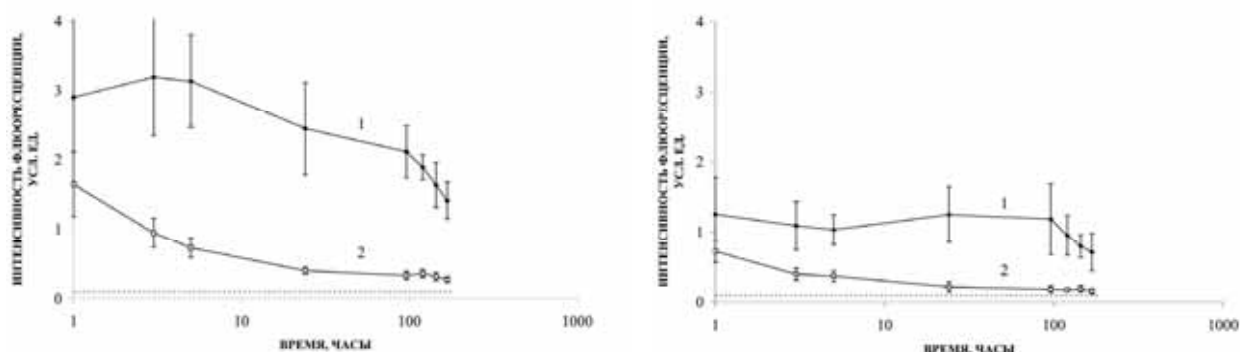


Рис. 4. Уровень накопления тиосенса при введении липосомальных дисперсий из расчета 6 мг/кг массы тела:

А – дисперсия № 1, основной размер липосом 76 нм;

Б – дисперсия № 2, липосомы размером 446 и 183 нм в соотношении 1:3.

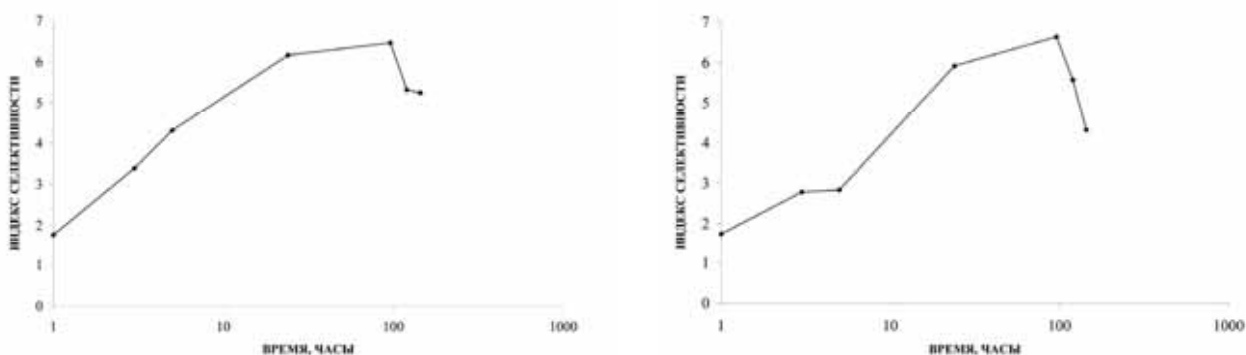


Рис. 5. Индекс селективности тиосенса при введении липосомальных дисперсий из расчета 6 мг/кг массы тела:

А – дисперсия № 1, основной размер липосом 76 нм;

Б – дисперсия № 2, липосомы размером 446 и 183 нм в соотношении 1:3.

через дефекты сосудов опухолей, а также быстрее выводятся из плазмы крови за счет поглощения ретикулоэндотелиальной системой и не вносят существенного вклада в накопление фотосенсибилизатора.

В дальнейшем планируется продолжить исследования накопления и эффективности ФДТ с использованием гомогенных липосомальных дисперсий тиосенса, отличающихся размером липосом, что позволит уточнить оптимальный диапазон их размеров и надлежащим образом выбрать технологию промышленной экструзии этого фотосенсибилизатора.

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

Работа канд. биол. наук И.Г. Мееровича поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых ученых МК-6258.2006.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников А.Ю., Борисова Л.М., Ворожцов Г.Н. и др. Фотосенсибилизатор, липосомальная форма фотосенсибилизатора и способ проведения фотодинамической терапии // Патент РФ №2257898 от 10 августа 2005 г. с приоритетом от 22 марта 2004 г.
2. Смирнова З.С., Меерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона // РБЖ. – 2004. – Т. 3, № 1. – Р. 54–60.
3. Awasthi V.D., Garcia D., Goins B.A., Phillips W.T. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits // International Journal of Pharmaceutics. – 2003. – 253. – Р. 121–32.
4. Boerman O.C., Oyen W.J.G., van Bloois L. et al. Optimization of Technetium-99m-Labeled PEG Liposomes to Image Focal Infection: Effects of Particle Size and Circulation Time // J. Nucl. Med. – 1997. – № 38. – Р. 489–93.
5. Dougherty T.J., Gomer J.C., Henderson B.W. et al. Photodynamic therapy // J. Natl. Cancer Inst. – 1998. – Vol. 90, № 12. – Р. 889–905.
6. Hashizume H., Baluk P., Morikawa Sh. et al. Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness // American Journal of Pathology. – 2000. – Vol. 156, № 4. – Р. 1363–80.
7. Ishida O., Maruyama K., Sasaki K., Iwatsuru M. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice // International Journal of Pharmaceutics. – 1999 – № 190 – Р. 49–56.
8. Nishiyama N., Arnida, Jang W.D. et al. Photochemical enhancement of transgene expression by polymeric micelles incorporating plasmid DNA and dendrimer-based photosensitizer // J. Drug Target. – 2006. – Vol. 14, № 6. – Р. 413–24.
9. Schmitt-Sody M., Strieth S., Krasnici S. et al. Neovascular Targeting Therapy: Paclitaxel Encapsulated in Cationic Liposomes Improves Antitumoral Efficacy // Clinical Cancer Research. – 2003. – Р. 2335–41.
10. Wu N.Z., Da D., Rudoll T.L. et al. Increased Microvascular Permeability Contributes to Preferential Accumulation of Stealth Liposomes in Tumor Tissue // Cancer Research. – 1993. – № 53. – Р. 3765–70.

Поступила 23.11.2006.

УДК 616.5:612.014.44:615.831

N.B. Morozova¹, R.I. Yakubovskaya¹, V.I. Chissov¹, V.M. Mizin², G.M. Pleshkov²

STUDY OF SKIN PHOTSENSITIVITY OF PHTHALOCYANINE SULPHONATED DERIVATIVES

¹Hertsen Moscow Research Institute of Oncology²State Research Center of Organic Products and Dyes Moscow

ABSTRACT

Skin photosensitivity of Phthalosens and Photosens, of the original preparations based on phthalocyanine sulphonated derivatives, has been studied in intact mice. It has been revealed that Phthalosens photosensitivity decreased 4.5–5.9 times 7 days after its administration in 1.0 mg/kg and 0.5 mg/kg therapeutic doses *versus* Photosens photosensitivity that decreased only 1.6–2.5 times when administered in therapeutic doses of 5.0 mg/kg and 2.0 mg/kg. No necrotic scab is being formed 7 days after the irradiation with Phthalosens injected in therapeutic doses while after the administration of Photosens in 5.0 mg/kg dose a necrotic scab is being formed in the irradiated area and remains for more than 5 days. This means that Phthalosens skin photosensitivity is lower than that of Photosens.

Key words: skin photosensitivity, phototoxicity, photodynamic therapy, a photosensitizer, biodistribution, Phthalosens, Photosens, a level of the normalized fluorescence.

Н.Б. Морозова¹, Р.И. Якубовская¹, В.И. Чиссов¹, В.М. Мизин², Г.М. Плешков²

ИЗУЧЕНИЕ КОЖНОЙ ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СУЛЬФИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФТАЛОЦИАНИНА

¹ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росздрав», Москва²ФГУП ГНЦ РФ «НИОПИК», Москва

РЕЗЮМЕ

В работе изучали кожную фоточувствительность сульфированных фталоцианинов: нового оригинального препарата фталосенс и препарата фотосенс у здоровых мышей. Исследования показали, что через 7 сут после введения фталосенса его кожная фоточувствительность снижается в 4,5–5,9 раза при использовании терапевтических доз 1,0 и 0,5 мг/кг, а кожная фоточувствительность фотосенса в терапевтических дозах 5,0 и 2,0 мг/кг – только в 1,6–2,5 раза. Образования некротического струпа через 7 сут после облучения с фталосенсом в терапевтических дозах не происходит, а с фотосенсом в дозе 5,0 мг/кг у мышей в зоне облучения образуется некротический струп, который сохраняется более 5 сут. Фталосенс обладает менее выраженной кожной фоточувствительностью, чем фотосенс.

Ключевые слова: фоточувствительность кожи, фототоксичность, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, биораспределение, фталосенс, фотосенс, уровень нормированной флуоресценции.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы фотодинамическая терапия (ФДТ) привлекает все больший интерес как новая перспективная технология лечения онкологических больных, обладающая большими потенциальными возможностями для терапии злокачественных опухолей. При ранних или поверхностно расположенных опухолях регрессия может достигать 95–100 % [4]. Однако этот метод имеет недостаток, который ограничивает его использование в клинической практике. Это – кожная фототоксичность (КФТ), связанная с длительным удержанием фотосенсибилизаторов (ФС) в коже.

Фотосенсибилизаторы, разрешенные к применению в настоящее время (Photofrin, фотогем) и находящиеся на различных стадиях клинических испытаний (фотосенс и др.), обладают длительной кожной фототоксичностью [1; 2; 3; 7; 8], из-за которой пациенты вынуждены длительное время после окончания лечения соблюдать световой режим. Поэтому большое внимание в развитии метода ФДТ уделяется поиску и разработке новых сенсибилизаторов с низкой кожной токсичностью и путям ее снижения. В связи с этим актуальным является изучение КФТ красителей на стадии доклинического исследования.

В литературе описаны различные подходы к оценке повреждения кожи в рамках изучения кожной фоточувствительности ФС. В качестве объектов исследования используются экспериментальные животные: мыши, хомяки, крысы, свиньи. В отдельных случаях чувствительность кожи оценивают у пациентов, принимающих участие в I и II фазах клинических испытаний новых ФС [7; 8; 9; 10]. Для облучения используют, как правило, модулированный различными способами солнечный свет в интервале от 200 до 2500 нм с плотностью энергии 44,4–167 Дж/см². Освещение проводят через 1–10 сут после введения препарата как в терапевтических дозах (ТД), так и в дозах, превышающих ТД в 3–5 раз [7]. Критериями оценки КФЧ может являться отек [7], эритема кожи [8; 9], морфологические изменения в коже, оцененные гистологическими методами [10].

Все эти методы позволяют оценить степень повреждения кожи при использовании различных сенсibilizаторов, визуально и гистологически, но не дают информации о фотоповреждении окружающей ткани во время сеанса ФДТ и сроках, в течение которых исчезают проявления кожной фототоксичности.

Цель данной работы – разработка простого доступного метода оценки кожной фоточувствительности на мышах для ФС на основе фталоцианинов.

Задачами исследования являлись: отработка скрининговой методики оценки кожной фототоксичности на здоровых мышах и изучение с помощью этого метода кожной токсичности нового препарата фталосенс в сравнении с его ближайшим аналогом – препаратом фотосенс, успешно применяемым в настоящее время в клиниках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Описание препаратов

Препарат фталосенс на основе безметалльного сульфотфалоцианина со средним содержанием сульфогрупп, равным 2,5, и препарат фотосенс, на основе смеси ди-, три- и тетрасульфопроизводных фталоцианина алюминия (производство ФГУП «ГНЦ НИОПИК», Россия).

Животные

В работе использовали мышей-гибридов BDF₁, здоровых самок весом 22–25 г, полученных из питомника «Столбовая».

Источники оптического излучения

Использовали 2 светодиодных источника оптического излучения. Источник оптического излучения для препарата фотосенс состоит из 1 светодиода с максимумом излучения 674–682 нм, диаметр светового пятна 10 мм. Источник оптического излучения для препарата фталосенс состоит из 3 светодиодов, имеющих угол расходимости выходного излучения 8° с максимумом излучения 685 нм. Световые пятна светодиодов совмещаются на расстоянии 25 мм от торцов их линз и имеют диаметр 10 мм. Плотность мощ-

ности контролировали с помощью измерителя ИПМО (НПО «Полус», Москва).

Методика исследования кожной фоточувствительности

Кожную фоточувствительность оценивали у мышей, которым за 7 сут до облучения шерсть в месте облучения (правое бедро) удаляли с помощью крема-депилятора. Препараты вводили внутривенно в терапевтических дозах (ТД) (0,5 и 1,0 мг/кг – фталосенс, 2,0 и 5,0 мг/кг – фотосенс) [5]. В качестве анестезии применяли 0,25%-ный раствор droperidoli в дозе 0,25 мг/мышь, который вводили внутривенно за 15 мин до облучения.

Облучение проводили с использованием светодиодных источников красного света, длина волны которых соответствовала максимуму поглощения красителей: фотосенс – 674–682 нм и фталосенс – 685 нм. Плотность энергии составляла 90 Дж/см² при плотности мощности 50 мВт/см² и диаметре светового пятна 10 мм. Используемая плотность мощности на порядок больше плотности мощности солнечного излучения в спектральном диапазоне, соответствующем поглощению ФС.

Облучение депилированного участка бедра мыши проводили в течение 30 мин через различные интервалы времени (Δt) после введения красителей: 2 ч (фталосенс), 4 ч (фотосенс) – сроки максимального накопления в коже, а также 1 и 7 сут после их введения.

Состояние облученного участка кожи животных и размеры отека оценивали сразу после и через каждые 24 ч после облучения до полного исчезновения проявлений кожной токсичности. Проводили визуальную оценку состояния кожи (наличие или отсутствие струпа), а также измеряли толщину бедра в 2 взаимно перпендикулярных проекциях с помощью электронного цифрового кронциркуля STORM_{TM} 3C301 «Central».

Критериями оценки кожной фоточувствительности являлись объем отека V и время его сохранения (T_v), наличие или отсутствие струпа и время его сохранения. Объем отека рассчитывали по формуле:

$$V = d_1 \times d_2 \times d_3,$$

где d_1 , d_2 – 2 взаимно перпендикулярных толщины бедра мыши;

d_3 – длина части бедра мыши, соответствующая диаметру светового пятна.

Рассчитывали также относительный объем отека (W) по формуле:

$$W = (V_2 - V_1) / V_1 \times 100 \%,$$

где V_1 и V_2 – объемы отека до и через различные интервалы времени после облучения соответственно.

Время сохранения отека относительно контроля (τ) рассчитывали по формуле:

$$\tau = (T_{v_o} - T_{v_k}) / T_{v_k} \times 100 \%,$$

где T_{v_o} и T_{v_k} – время сохранения отека в опытной и контрольной группах соответственно.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с помощью статистических программ с использованием критерия

Стьюдента. Достоверными считали отличия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследования необходимо было выбрать и отработать методику исследования кожной фототоксичности сульфированных фталоцианинов (препаратов фталосенса и фотосенса) на здоровых мышах-гибридах BDF₁.

В ходе работы решали следующие вопросы: обоснование выбора доз ФС; подбор адекватных источников облучения, плотности мощности и плотности энергии; определение интервалов времени между введением ФС и облучением (Δt); установление критериев качественной и количественной оценки кожной фототоксичности.

Ранее в исследованиях *in vivo* на животных-опухоленосителях нами показано, что терапевтические дозы фталосенса (0,5–1,0 мг/кг) в 4–8 раз ниже, чем фотосенса (2,0–5,0 мг/кг). Противоопухолевая активность при использовании ТД у фталосенса выше, чем у фотосенса [10]. Вследствие этого оценку кожной токсичности препаратов, а также фотоповреждение здоровой кожи после сеанса ФДТ проводили при использовании терапевтических доз: 0,5 и 1,0 мг/кг (фталосенс) и 2,0 и 5,0 мг/кг (фотосенс).

Максимум спектра поглощения фталосенса наблюдается при $\lambda = 685$ нм, фотосенса – при $\lambda = 675$ нм. Соответственно облучение проводили, используя светодиодные источники с максимумом излучения 685 нм (фталосенс) и 674–682 нм (фотосенс), плотность мощности – 50 мВт/см², плотность энергии – 90 Дж/см² (оптимальные условия облучения для исследуемых ФС). Учитывая, что фотоповреждение кожи происходит как во время сеанса ФДТ (характерная местная реакция кожи), так и после сеанса ФДТ (общая реакция кожи при несоблюдении светового режима), для одновременной оценки этих параметров были выбраны жесткие условия облучения. Метод позволяет оценить повреждение кожи в зоне облучения через различное время после инъекции ФС.

Интервалы времени между введением ФС и облучением (Δt) были подобраны с учетом их флюоресценции в коже [6]. С целью определения уровня мономерной, то есть фотоактивной формы ФС, проводили динамическое исследование флюоресценции в коже, которое для обоих препаратов оказалось дозозависимым.

Максимальное значение нормированной флюоресценции (ФН) фталосенса в коже наблюдается в интервале от 5 мин до 24 ч после введения. Оптимальным временем проведения ФДТ с препаратом фталосенсом является 2 ч. Максимальное значение нормированной флюоресценции фотосенса в коже наблюдается через 1–4 ч после введения. Оптимальным временем проведения ФДТ с фотосенсом является 4–24 ч. Поэтому облучение кожи проводили при максимальном накоплении ФС в коже в сроки, соответствующие срокам проведения ФДТ – 2 ч для фталосенса и 4 ч для фотосенса, а также после сеанса облучения через 24 ч и 7 сут после введения препаратов.

За основу критериев оценки кожной фоточувствительности были выбраны: эритема кожи (наличие или отсутствие струпа) – качественный критерий, объем отека (V) и время его сохранения (T_v) – количественный критерий.

Результаты проведенных исследований показали, что у всех животных после облучения в течение 1-х сут развивался отек, причем интенсивность отека зависела от дозы препарата для всех исследованных интервалов времени (рис. 1, А, Б и 2, А, Б).

Относительный объем отека (W) для всех интервалов времени с увеличением дозы красителей в 2–2,5 раза увеличивался в 1,5–2 раза. В последующий период времени отеки во всех группах медленно уменьшались. Фотоповреждение кожи во время сеанса ФДТ для препаратов фталосенса и фотосенса в ТД одинаково.

В то же время имеются существенные различия. Так, при увеличении интервала времени Δt между введением фталосенса и облучением до 7 сут τ (время сохранения отека относительно контроля) пропорционально уменьшалось. Это свидетельствовало о снижении кожной фоточувствительности фталосенса

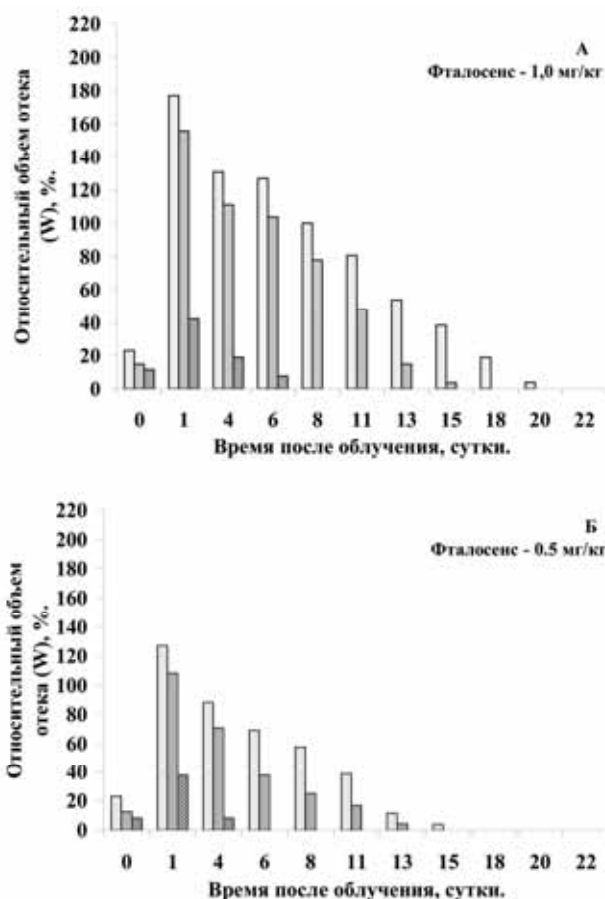


Рис. 1. Относительный объем отека (W) после облучения intactных мышей, получивших различные дозы фталосенса в зависимости от интервала между введением препарата и облучением:

— 2 ч;
— 24 ч;
— 7 сут.

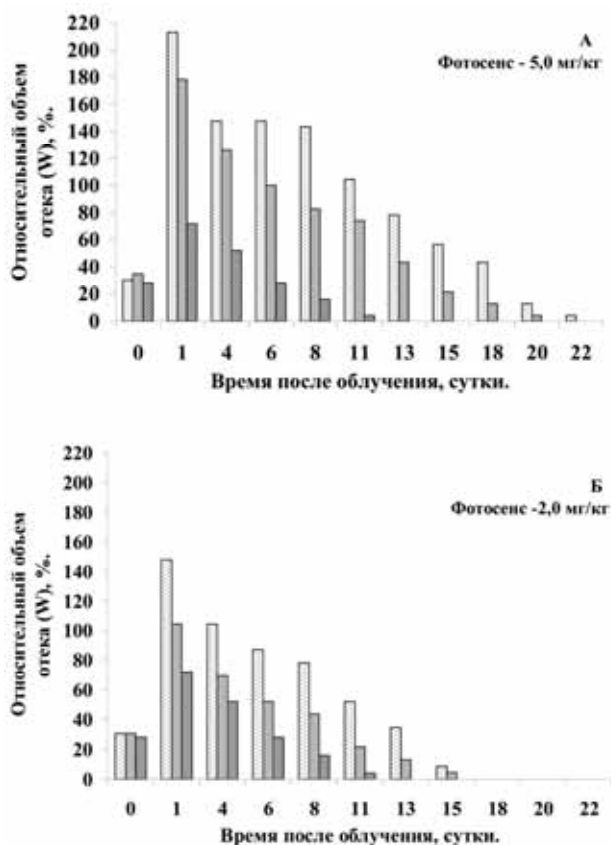


Рис. 2. Относительный объем отека (W) после облучения intactных мышей, получивших различные дозы фотосенса в зависимости от интервала между введением препарата и облучением:

— 2 ч;
— 24 ч;
— 7 сут.

через 7 сут после введения в 5,9 раза при использовании дозы 0,5 мг/кг и в 4,5 раза при использовании дозы 1,0 мг/кг. Для фотосенса при увеличении интервала до 7 сут τ снижалась в 2,5 раза при использовании дозы 2,0 мг/кг и в 1,6 раза – при использовании дозы 5,0 мг/кг (см. таблицу).

У животных после введения фталосенса и облучения через 2 и 24 ч в течение 3 сут образовывался некротический струп, причем при облучении через 2 ч время сохранения струпа не зависело от дозы. При облучении через 7 сут после введения струпы отсутствовали. У животных после введения фотосенса некротический струп образовывался при использовании дозы 2,0 мг/кг только после облучения через 4 ч, а при использовании дозы 5,0 мг/кг струп образовывался после облучения через все интервалы времени. При облучении через 4 ч время сохранения струпа с увеличением дозы препарата увеличивалось. С увеличением интервала от 4 ч до 7 сут при использовании фотосенса в дозе 5 мг/кг время сохранения струпа уменьшалось.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что препарат фталосенс обладает менее продолжительной и менее выраженной кожной фоточувствительностью, чем применяемый в настоящее время препарат фотосенс.

ВЫВОДЫ

1. Разработан простой экономичный метод оценки кожной фоточувствительности, позволяющий в короткие сроки определить фототоксичность ФС в коже.
2. Проведено сравнение кожной фоточувствительности нового оригинального препарата фталосенс и препарата фотосенс в терапевтических дозах у здоровых мышей BDF₁.
3. Показано, что фотоповреждение кожи во время сеанса ФДТ для фталосенса и фотосенса в ТД одинаково. Через 7 сут после введения препаратов в терапевтических дозах кожная фоточувствительность фталосенса ниже, чем фотосенса.

Время сохранения отека (T_v) и струпа после облучения мышей с фталосенсом и фотосенсом в зависимости от дозы препарата и времени после его введения. Световая доза 90 Дж/см²

Препарат	Терапевтическая доза, мг/кг	Интервал после введения препаратов, Δt	Время сохранения отека		Время сохранения струпа, сут
			T _v , сутки	τ*, %	
Фталосенс	0,5	2 ч	15,7±0,6	292,5	7,7±0,6
		24 ч	12,7±1,3	217,5	4,3±2,0
		7 сут	6,0±0,1	50,0	отсутствует
	1,0	2 ч	19,0±1,9	375,0	7,7±2,1
		24 ч	15,0±1,0	275,0	5,7±0,8
		7 сут	7,3±0,6	82,5	отсутствует
Фотосенс	2,0	4 ч	18,0±0,9	300,0	6,0±0,9
		24 ч	14,3±1,2	217,8	отсутствует
		7 сут	10,0±1,9	122,2	отсутствует
	5,0	4 ч	23,3±0,6	417,8	10,0±1,9
		24 ч	19,9±1,9	322,2	6,7±2,1
		7 сут	16,0±0,9	255,6	5,3±1,5

*Время сохранения отека относительно контроля, %

Работа выполнена в рамках Программы «Борьба со злокачественными новообразованиями» при финансовой поддержке мэрии г. Москвы и МКНТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вакуловская Е.Г., Кувишинов Ю.П., Поддубный Б.К. Фотодинамическая терапия и флюоресцентная диагностика с фотосенсибилизатором фотосенс у больных раком желудка // РБЖ. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 61–5.
2. Вакуловская Е.Г., Летагин В.П., Погодина Е.М. Фотодинамическая терапия и флюоресцентная диагностика у больных раком молочной железы // РБЖ. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 57–60.
3. Новикова Е.Г., Трушина О.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия предопухолевой патологии и начальной формы рака шейки матки // Российский онкологический журнал. – 2005. – № 6. – С. 28–33.
4. Избранные лекции по клинической онкологии. – Под ред. акад. РАМН В.И. Чиссова, проф. С.Л. Дарьяловой. – Москва, 2000. – С. 105–8.
5. Якубовская Р.И., Морозова Н.Б., Панкратов А.А. и др. Изучение фотоиндуцированной противоопухолевой активности препарата фталосенса у животных с опухолями различного гистогенеза // Российский онкологический журнал. – 2006. – № 3. – С. 26–32.
6. Якубовская Р.И., Морозова Н.Б., Чиссов В.И. и др. Биораспределение препарата фталосенса у интактных животных и животных с опухолями различного гистогенеза // Российский онкологический журнал. – 2007. – № 1. – С. 37–42.
7. Anderson C.Y., Frislin K., Tubesing K.A. et al. A Comparative Analysis of Silicon Phthalocyanine Photosensitizers for in vivo Photodynamic Therapy of RIF-1 Tumors in C3H Mice // J. Photochemistry and Photobiology. – 1998. – Vol. 67(3). – P. 332–6.
8. Bellnier D.A., Greco W.R., Nava H. et al. Mild skin photosensitivity in cancer patients following injection of Photochlor (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a; HPPH) for photodynamic therapy // Cancer Chemother Pharmacol. – 2006. – Vol. 57(1). – P. 40–5.
9. Weersink R.A., Forbes J., Bisland S. et al. Assessment of cutaneous photosensitivity of TOO-KAD (WST09) in preclinical animal models and in patients // Photochem Photobiol. – 2005. – Vol. 81(1). – P. 106–13.
10. Zellweger M., Padu A., Monnier P. et al. Fluorescence pharmacokinetics of Letetium Texaphyrin (PCI-0123, Lu-Tex) in the skin and in healthy and tumoral hamster cheek-pouch mucosa // J. Photochemistry and Photobiology. – 2000. – Vol. 55. – P. 56–62.

Поступила 28.12.2006.

УДК 616-006-085/37:612.017.1

M.A. Baryshnikova¹, N.K. Akhmatova², A.M. Karamzin¹

IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF SUBLINGUAL FORM OF GALAVIT

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums RAMS, Moscow

ABSTRACT

A comparative study of immunomodulating activity of sublingual and injection forms of Galavit was conducted *in vivo*. The ratio of spleen mononuclear leukocytes (MNL) subpopulations and expression of serum cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12) was measured. The results showed that sublingual and injection forms of Galavit had similar immunomodulating effect, which was registered as increased number of natural killers (NK) and activated CD25⁺- lymphocytes in MNL population and as enhanced concentrations of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12 in mice blood.

Key words: Galavit, mononuclear leukocytes, serum cytokines, immunomodulating activity.

M.A. Барышникова¹, Н.К. Ахматова², А.М. Карамзин¹

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ФОРМЫ ГАЛАВИТА

¹ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²ГУ НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Проведено сравнительное изучение иммуномодулирующей активности сублингвальной и инъекционной форм галавита *in vivo*. У животных определяли соотношение субпопуляций мононуклеарных лейкоцитов селезенки и уровень сывороточных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12). Установлено, что сублингвальная и инъекционная формы галавита оказывают сходное иммуномодулирующее действие, проявляющееся в увеличении содержания NK и активированных CD25⁺-лимфоцитов в популяции мононуклеарных лейкоцитов, а также в повышении уровня концентраций IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12 в крови мышей.

Ключевые слова: галавит, мононуклеарные лейкоциты, сывороточные цитокины; иммуномодулирующая активность.

ВВЕДЕНИЕ

Иммуномодулятор галавит проявляет противовоспалительную активность вследствие способности обратимо ингибировать синтез гиперактивированными макрофагами провоспалительных цитокинов TNF и IL-1 или стимулировать их при исходной недостаточности. Галавит способен восстановить угнетенную фагоцитарную функцию макрофагов и нейтрофилов и, следовательно, противоинфекционную защиту [3; 8]. Высказывалось предположение, что эффекты галавита опосредовались стимуляцией NK и CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов. При проведении клинических исследований было установлено, что применение инъекционной формы галавита у онкологических больных на фоне химиотерапии приводит к нормали-

зации иммунологических параметров [4–7]. Наряду с инъекционной разработана более удобная для применения сублингвальная форма препарата, которая, как установлено в экспериментальных исследованиях, оказывает стимулирующее влияние на функциональную активность лимфоцитов (пролиферативную способность и NK-активность) [1; 2]. Цель настоящей работы – изучение влияния сублингвальной формы галавита на субпопуляционный состав лимфоцитов и цитокиновый профиль у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мышам линии СВА вводили галавит 200 мкг однократно, внутривентально, или сублингвально с помощью зонда по 40 мкг каждый час в течение 5 ч

(суммарная доза составила 200 мкг). Интервал дачи препарата был выбран экспериментально при визуальном контроле рассасывания части таблетки с чередованием сторон ее закладывания. Контрольной группе животных сублингвально давали крахмал. В каждой группе было использовано по 10 животных.

Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Получение суспензии мононуклеарных лейкоцитов и лимфоцитов мышей

Селезенки мышей гомогенизировали в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва) и трижды осаждали центрифугированием. Взвесь клеток селезенки центрифугировали при 400 g в течение 30 мин в градиенте плотности фиколюрографина («Pharmacia», плотностью 1,077 г/см³). Мононуклеарные лейкоциты (МЛ), образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и 3-кратно отмывали средой 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g. Для получения лимфоцитов взвесь МЛ в среде RPMI-1640 разливали во флаконы и не прилипшие клетки переводили в среду культивирования (10⁶ клеток в 1 мл обогащенной среды RPMI-1640).

Иммуноферментный анализ

Уровень цитокинов определяли в сыворотках методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы Biosource (Бельгия).

Проточная цитометрия (FACS-анализ)

Определение экспрессии поверхностных маркеров мононуклеаров и ДК проводили при помощи моноклональных антител (Caltag Laboratories, USA) против соответствующих антигенов. Клетки отмывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 1 %-ной фетальной телячьей сывороткой (ФТС) и окрашивали FITC (флюоресцинизотиоционат) и PE (фикоэритрин) мечеными антителами согласно инструкции производителя. Отмы-

вали 2 раза холодным ФСБ с 1% ФТС. Клетки фиксировали ФСБ, содержащим 1 % парформальдегида. Результаты учитывали на проточном цитометре FACS Calibur (фирмы Becton Dickinson, США) с 15 мВт 488 аргонным лазерным и 585/42 (FL2) дискриминационным фильтром. На МЛ исследовались уровни экспрессии дифференцировочных антигенов CD3, CD4, CD8, NK1.1; активационных антигенов CD25, молекул МНС. В качестве изотипического контроля использовали крысиные IgG1 и IgG2.

Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WINMDI 2.8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование субпопуляционного состава МЛ селезенки мышей после парентерального и сублингвального введения галавита выявили качественно сходные изменения. При этом отмечалось увеличение экспрессии на мембранах МЛ активационных молекул (CD25) и антигенов NK (NK1.1). Содержание в популяции МЛ клеток, экспрессирующих Т-клеточные дифференцировочные антигены (CD3, CD4, CD8) и молекулы антигенной презентации (МНС), не отличалось от контрольной серии (см. таблицу и рис. 1). Хотя сублингвальная форма в меньшей степени влияла на увеличение в популяции МЛ CD25⁺-клеток и НК, тем не менее эти изменения были достоверными по сравнению с интактными особями.

Сублингвальное и внутрибрюшинное введение галавита приводит к повышению уровня IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-12 (рис. 2). При этом в наибольшей степени по сравнению с контрольной серией повышается уровень IL-1β (с 20,8±3,2 пг/мл у интактных животных до 44,8±4,8 пг/мл и 44,8±2,9 пг/мл при в/бр и сублингвальном введении галавита соответственно; p<0,05) и TNF-α (с 13,3±2,1 пг/мл у интактных животных до 28,7±3,1 пг/мл и 24,3±3,2 пг/мл при в/бр и сублингвальном введении галавита соответственно; p<0,05). Кроме того, отмечается очевидная тенденция к увеличению сывороточных концентраций IFN-γ и IL-12 у мышей, получавших галавит, по сравнению с животными контрольной группы.

Уровни экспрессии поверхностных маркеров МЛ селезенки мышей линии СВА при воздействии инъекционной и сублингвальной форм галавита

МЛ селезенки	CD3	CD4	CD8	NK	CD25	МНС I	МНС II
Интакные особи	45,6±3,5	30,2±2,5	4,3±0,4	1,5±0,3	5,4±0,3	12,3±0,1	12,2±0,2
Галавит инъекционная форма	48,3±5,2	23,7±3,8	7,3±0,5	22,3±3,8*	29,5±3,4*	13,2±0,5	15,7±1,3
Галавит сублингвальная форма	46,2±5,3	26,7±2,0	7,3±0,5	16,3±2,0*	22,2±4,6*	12,2±1,5	14,7±2,4

*Статистически значимые различия (p<0,05) по t-критерию Стьюдента для сопряженных пар признаков по сравнению с МЛ интактных мышей

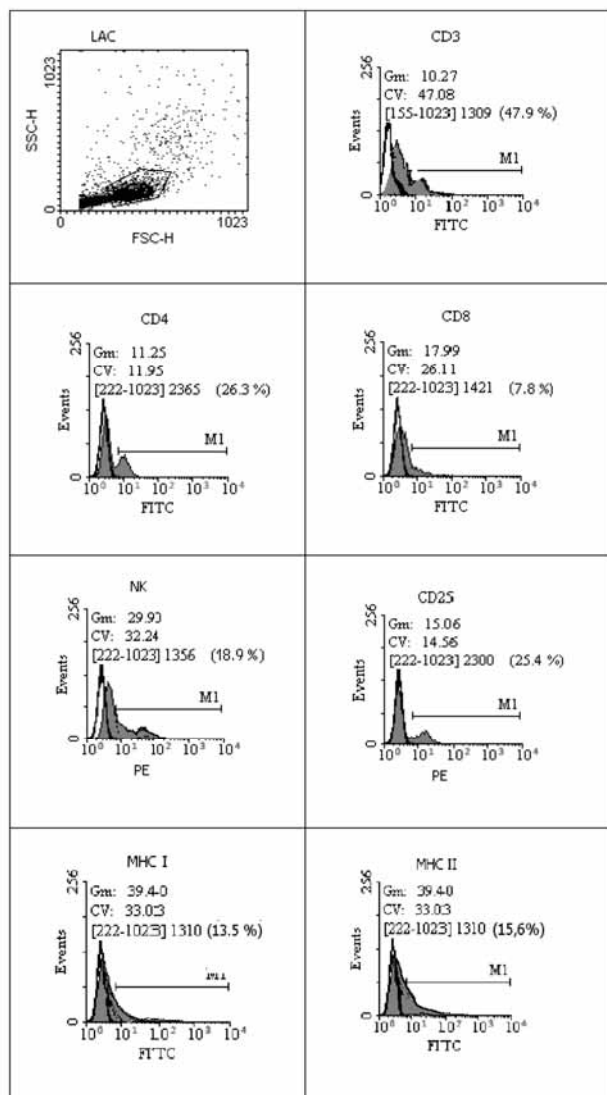


Рис. 1. Гистограммы, отражающие экспрессию поверхностных молекул МЛ селезенки мышей линии СВА после воздействия сублингвальной формы галавита:

Верхний ряд, дотплот (популяция МЛ в очерченной области);

левый пик – аутофлуоресценция клеток при использовании изотипического контроля, правый – флуоресценция (FITC – флуоресцеинизотиоцианат и R-PE фикоэритрин) после окрашивания соответствующими антителами.

По оси ординат – количество клеток;

по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции.

CD — дифференцировочные антигены;

MHC I, II — молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II классов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что сублингвальная форма препарата галавит оказывает иммуномодулирующее действие, сходное с таковым при воздействии инъекционной формы препарата. Изменение субпопуляционного состава МЛ селезенки

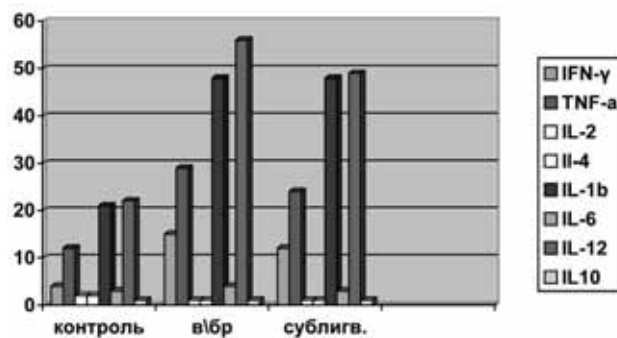


Рис. 2. Концентрации сывороточных цитокинов у мышей при воздействии инъекционной и сублингвальной форм галавита:

по оси ординат – концентрация цитокинов (пг/мл);

по оси абсцисс: контроль – контрольная группа; в/бр – внутривенное введение инъекционной формы галавита, сублингв. – введение сублингвальной формы галавита.

мышей, получавших галавит, характеризуется прежде всего увеличением содержания NK и повышением количества активированных клеток, экспрессирующих рецептор к IL-2 (CD25). Следует отметить, что в данных условиях в ответ на воздействие галавита регистрируется изолированное повышение CD25⁺-клеток без увеличения уровня экспрессии дифференцировочного антигена CD4⁺. Эти данные позволяют предположить, что в рассматриваемых условиях галавит, вероятно, не приводит к увеличению супрессорной субпопуляции лимфоцитов (CD25⁺/CD4⁺). Представленные материалы согласуются с высказанными ранее предположениями о способности галавита оказывать опосредованное влияние на NK. Исследования спектра цитокинов при применении галавита позволили установить, что по характеру изменения концентраций этих регуляторных пептидов действие сублингвальной формы препарата не отличается от инъекционной. Сублингвальная форма галавита, так же, как инъекционная, достоверно повышает уровень TNF-α и IL-1β в сыворотке крови животных, что соответствует полученным ранее данным [5] о влиянии изучаемого препарата на продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами. Кроме того, показано увеличение концентрации IL-12, что может быть связано с усилением секреции этого цитокина дендритными клетками. Тенденция к повышению IFN-γ, вероятно, обусловлена активацией NK цитокинами, продуцируемыми макрофагами и дендритными клетками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сублингвальная и инъекционная формы галавита оказывают сходное иммуномодулирующее действие в опытах *in vivo*, проявляющееся в увеличении содержания NK и активированных CD25⁺-лимфоцитов в популяции МЛ, а также в повышении уровня сывороточных провоспалительных и регуляторных цитокинов (IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-12).

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышникова М.А., Орлова О.Л., Шпрах З.С. Разработка новой лекарственной формы галавита в виде сублингвальных таблеток // РБЖ. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 86–90.
2. Барышникова М.А., Доненко Ф.В., Шубина И.Ж., Киселевский М.В. Влияние сублингвальной формы галавита на иммунофенотип и функциональную активность иммунокомпетентных клеток мышей // РБЖ. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 43–6.
3. Галавит в эксперименте и клинике / Под ред. М.Т. Абидова. – М., 1999. – 60 с.
4. Добрица В. П., Ботерашвили Н.М., Добрица Е.В. Современные иммуномодуляторы для клинического применения / Руководство для врачей. – СПб.: Политехника. – С. 164–5.
5. Донцов В.И., Подколзин А.А. Галавит – новый иммуномодулятор с биоактивирующим и регенерирующим эффектом // Ежегодник Национального геронтологического центра. – 2001. – Вып. 4. – С. 70–80.
6. Дудка В.Ю. Опыт применения препарата «Галавит» в терапии урогенитальной герпетической инфекции // ГУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер», Материалы XXXVII научно-практической конференции дерматовенерологов и врачей смежных специальностей. – СПб, 2002.
7. Коробкова Л.И., Вельшер Л.З., Германов А.Б. и др. Роль иммуномодулятора Галавит в онкологической и хирургической практике // РБЖ. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 87–92.
8. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Вторичные иммунодефициты: клиника, диагностика, лечение // Иммунология. – 1999. – № 2. – С. 14–7.

Поступила 23.11.2006.

УДК 616.31/.32-006.04-089:615.277.3

I.V. Vikhlyanov, Y.N. Shoykhet, A.F. Lazarev

INTRAOPERATIVE LOCAL BOLUS DOSING OF 5-FLUOROURACIL IS ONE OF THE WAYS TO IMPROVE ABLASTICS OF SURGICAL INTERVENTION IN PATIENTS WITH OROPHARYNGEAL TUMOURS

*The Altai branch of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Barnaul
Altai State Medical University, Barnaul
Altai Regional Oncology Dispensary, Barnaul*

ABSTRACT

The original technique of intraoperative local bolus dosing of chemotherapeutic agents has been developed in treatment of oropharynx tumours.

In tongue tumours after the block of venous blood flow, lingual artery ligation (at the site of origin of artery from the external carotid artery) and its catheterization were performed. Intraoperative local bolus dosing of 5-fluorouracil was administered before and after removing of primary tumour.

In case of the process in posterior portion of the mouth, fauces or local tumours, during fascia compartment excision of paracervix, venous blood flow was blocked similarly, the external carotid artery at the site higher the origin of upper thyroid artery was ligated. Then in accordance with the location of the tumour, catheterization of the external carotid artery trunk at the site lower the origin of lingual artery was performed. The external carotid artery was ligated once more at the site higher the origin of facial artery. Intraoperative bolus dosing of 5-fluorouracil was administered before and after removing of primary tumour.

The study of a long-term survival in the given group of patients has demonstrated shift of recurrent tumour from the end of the first year to the middle of the third year and increase of survival rate during the first two years after operation.

Key words: oropharynx tumours., chemotherapeutic agents, intraoperative introduction.

И.В. Вихлянов, Я.Н. Шойхет, А.Ф. Лазарев

ИНТРАОПЕРАЦИОННОЕ БОЛЮСНОЕ ВВЕДЕНИЕ 5-ФТОРУРАЦИЛА – ОДИН ИЗ ПУТЕЙ ПОВЫШЕНИЯ АБЛАСТИЧНОСТИ ОПЕРАТИВНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ ЗОНЫ

*Алтайский филиал ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул
ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», Барнаул
ГУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», Барнаул*

РЕЗЮМЕ

Разработана оригинальная методика интраоперационного болюсного введения химиопрепаратов при опухолях орофарингеальной зоны.

При опухолях языка после блокады венозного кровотока производилась перевязка язычной артерии у места ее отхождения от наружной сонной артерии, выполнялась ее катетеризация. Производилось интраоперационное болюсное введение 5-фторурацила до и после удаления препарата.

При расположении процесса в области задних отделов полости рта, ротоглотке либо при местнораспространенных опухолях в ходе выполнения фасциально-фулярного иссечения клетчатки шеи аналогично блокировался венозный кровоток, перевязывалась наружная сонная артерия выше отхождения верхней щитовидной артерии, затем, учитывая зону расположения опухоли, производилась катетеризация ствола наружной сонной артерии ниже отхождения язычной артерии, наружная сонная артерия перевязывалась повторно выше отхождения нижнечелюстной артерии. Производилось интраоперационное болюсное введение 5-фторурацила до и после удаления препарата.

Изучение отдаленной выживаемости у данной группы больных продемонстрировало смещение срока выявления рецидивов опухоли с конца 1-го года наблюдения на середину 3-го года наблюдения, повышение выживаемости больных в первые 2 года после операции.

Ключевые слова: орофарингеальный рак, химиопрепараты, интраоперационное введение.

ВВЕДЕНИЕ

Опухоли орофарингеальной зоны составляют до 20 % среди опухолей головы и шеи [2]. Большинство пациентов (до 60–70 %) поступают на специализированное лечение с местнораспространенными процессами (III–IV стадии), что делает радикальное лечение этой группы больных достаточно трудной задачей [2; 4]. За последнее время было проведено достаточно большое количество исследований, посвященных вопросам комбинированного и комплексного лечения, в том числе разработке функционально-сохраняющих и комбинированных оперативных вмешательств [4].

Одной из основных проблем в лечении больных с опухолями орофарингеальной зоны являются местные рецидивы опухоли, возникшие до разработки комбинированных оперативных вмешательств у 20–40 % больных [7]. Однако проблема повышения абластичности оперативного вмешательства и, следовательно, снижения количества рецидивов лежит не только в плоскости повышения хирургической агрессии в отношении опухоли. Снижения количества опухолевых клеток в послеоперационной ране можно добиться следующими способами: применением интраоперационной лучевой терапии (ИОЛТ), а также путем интраоперационного депонирования химиопрепаратов в ложе удаленной опухоли.

Пионерами в использовании ИОЛТ при опухолях головы и шеи стали P. Garret et al. [11], которые последовательно занимались вопросами лечения местнораспространенного рака полости рта, ротоглотки и гортани, а также метастазов в лимфатические узлы шеи. В последующий исторический промежуток были детально оценены возможности ИОЛТ при лечении как первичных опухолевых процессов, так и при рецидивах опухолей и метастазах в лимфатические узлы шеи [9; 12; 13].

Рядом авторов зафиксировано удлинение безрецидивного периода и повышение выживаемости в течение 1-го – 2-го годов после окончания лечения. При этом основное число развившихся рецидивов и метастазов приходилось на 2-ю половину 3-го года наблюдения [13; 14]. Однако практически все авторы отмечают наличие ранних и поздних осложнений ИОЛТ, которые нивелируют ценность данного метода [8; 10; 14].

Альтернативой ИОЛТ является депонирование химиотерапевтических препаратов в ложе удаленной опухоли [3; 5; 6]. В работах А.Ф. Лазарева с соавт. [3] показано отчетливое увеличение 2-летней выживаемости больных основной группы (при интраоперацион-

ном депонировании 5-фторурацила) по сравнению с больными контрольной группы без использования данной методики. В области опухолевой патологии головы и шеи вопросы интраоперационного депонирования препаратов были достаточно хорошо разработаны при опухолях придаточных пазух полости носа [6]. В числе последних публикаций необходимо упомянуть работы А.В. Ваккера с соавт. [1], которые применили депонированные формы цисплатина у нерадикально оперированных больных с опухолями головы и шеи. Авторами зарегистрировано снижение количества рецидивов и удлинение срока ремиссий у данной группы больных. В то же время вопросы применения интраоперационного депонирования химиопрепаратов при опухолях орофарингеальной зоны разработаны недостаточно. Это, очевидно, связано с анатомическими особенностями орофарингеальной зоны и отсутствием послеоперационной полости, где могли бы быть размещены полимерлекарственные комплексы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основу работы положены данные о 194 больных плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта и ротового отдела глотки. В зависимости от объема лечения все больные были разделены на 2 группы.

I группа – основная. 84 пациента получали комплексное лечение по схеме: 2 курса регионарной внутриартериальной химиотерапии (цисплатин + 5-фторурацил), оперативное лечение, послеоперационный курс дистанционной лучевой терапии.

II группа – группа сравнения. 110 пациентов получали комбинированное лечение, которое включало оперативное вмешательство и лучевую терапию. Эта группа больных содержала 2 подгруппы. В 1-ю подгруппу вошли 49 больных, которым проведена предоперационная лучевая терапия, а затем операция. Во 2-й подгруппе – 61 больной, которым проведена операция и последующая лучевая терапия.

У всех пациентов был верифицирован плоскоклеточный рак различной степени дифференцировки. Превалировали опухоли слизистой оболочки полости рта. Они составили 64,3 % больных в основной группе, 71,4 % в 1-й и 77,0 % во 2-й подгруппе группы сравнения. Распространенность первичной опухоли T₃N₀₋₃ была зафиксирована у 60,6 % больных основной группы, 56,0 % и 65,6 % больных соответственно в 1-й и 2-й подгруппах группы сравнения. Пациенты с распространенностью процесса T₂N₀₋₃ составили 29,8 % больных основной группы и 35,3 %, 27,8 % больных соответственно в 1-й и 2-й подгруппах груп-

пы сравнения. Распространенность процесса T_4N_{0-3} составила 9,5 % больных основной группы и 10,2 %, 6,5 % больных соответственно в 1-й и 2-й подгруппах группы сравнения.

У больных основной группы на этапе оперативного лечения с целью повышения абластичности оперативного вмешательства осуществлялось интраоперационное болюсное введение 5-фторурацила.

В зависимости от топике расположения опухоли в полости рта и ротоглотке интраоперационное болюсное введение химиопрепаратов осуществлялось 2 разными способами.

При расположении процесса в области задних отделов полости рта, ротоглотке либо при местнораспространенных процессах в ходе выполнения фасциально-фулярного иссечения клетчатки шеи тщательно выделялись и последовательно перевязывались лицевая, глоточные и язычные вены. Производилась перевязка наружной сонной артерии выше отхождения верхней щитовидной артерии. Учитывая зону расположения опухоли, производилась катетеризация ствола наружной сонной артерии ниже отхождения язычной артерии. Наружная сонная артерия перевязывалась повторно выше отхождения нижнечелюстной артерии. Производилось интраоперационное болюсное введение 5-фторурацила в дозировке 250 мг/м² (рис. 1).

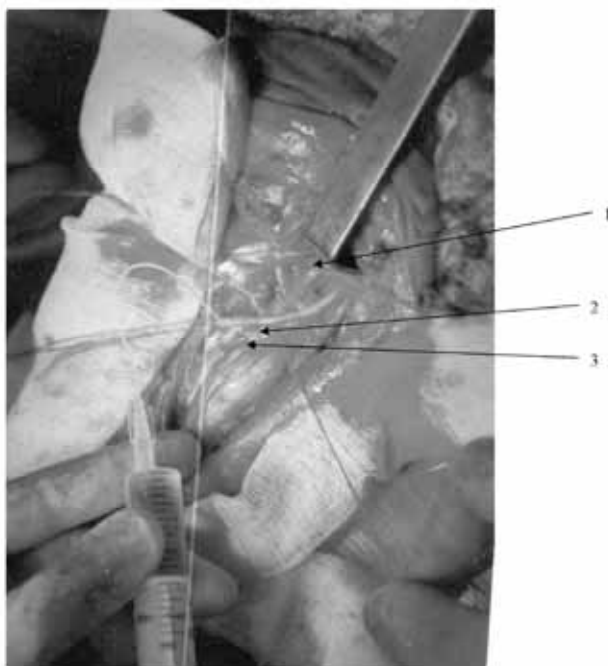


Рис. 1. Интраоперационное болюсное введение химиопрепарата в области первичного очага путем катетеризации наружной сонной артерии:

- 1 – перевязка наружной сонной артерии выше отхождения лицевой артерии;
- 2 – катетеризация наружной сонной артерии;
- 3 – перевязка наружной сонной артерии выше отхождения верхней щитовидной артерии.

После электрорезекции первичного очага повторно производилось депонирование 5-фторурацила в дозе 250 мг/м². Катетер удалялся.

При расположении опухолевого процесса в области языка после перевязки лицевой, язычных и глоточных вен производилась перевязка язычной артерии у места ее отхождения от наружной сонной артерии. Выполнялась катетеризация язычной артерии. Производилось интраоперационное болюсное введение 5-фторурацила в дозировке 250 мг/м² (рис. 2).

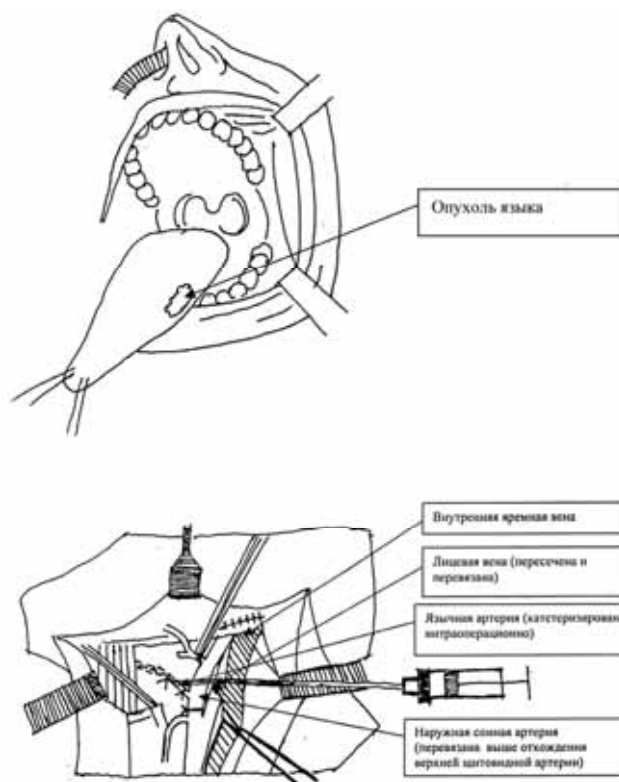


Рис. 2. Интраоперационное болюсное введение препарата в области первичного очага путем катетеризации соответствующей ветви наружной сонной артерии

После электрорезекции первичного очага повторно производилось депонирование 5-фторурацила в дозе 250 мг/м². Катетер удалялся.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была произведена оценка выживаемости в течение 5 лет больных основной группы и группы сравнения (рис. 3).

Было выявлено, что у больных основной группы, в отличие от больных группы сравнения, зафиксировано статистически значимое повышение выживаемости в течение 1-го – 2-го года после окончания лечения. При этом основное число развившихся рецидивов и метастазов приходилось на середину 3-го года наблюдения. Разница в выживаемости между пациентами сохранялась на протяжении 5 лет наблюдения.

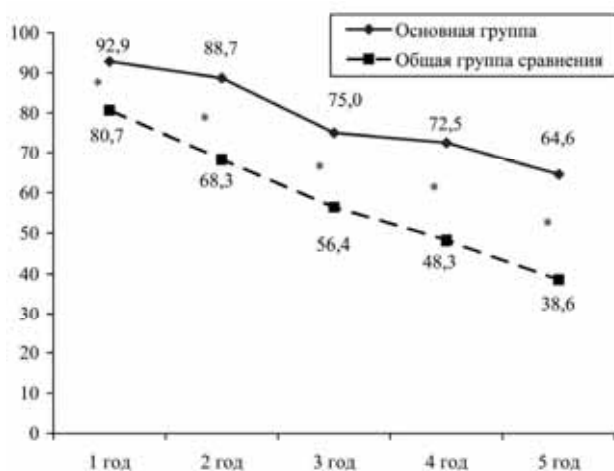


Рис. 3. Сравнительная оценка выживаемости больных плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта и ротового отдела глотки в основной группе и группе сравнения:

*статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Таким образом, применение интраоперационного болюсного введения химиопрепаратов у больных с опухолями орофарингеальной зоны позволяет удлинить безрецидивный период, повысить выживаемость больных в течение 5 лет наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ваккер А.В. Локальная химиотерапия депонированной формой цисплатина у больных с опухолями головы и шеи // Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ. – Минск, 2004. – С. 8.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004 г. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2006. – Т. 17. – С. 47–51.
3. Лазарев А.Ф., Шойхет Я.Н. Интраоперационное внутрибрюшинное депонирование противоопухолевых препаратов. – Оптимизация методов хирургического и лекарственного лечения рака желудка. – Барнаул, 1996. – С. 121–38.
4. Любаев В.Л., Пачес А.И., Пустынский И.Н. Современное состояние проблемы лечения местнораспространенного рака слизистой оболочки полости рта и ротоглотки // Материалы III съезда онкологов и

радиологов СНГ. – Минск, 2004. – С. 75–8.

5. Новикова Е.Г., Борисов В.И., Антошечкина Е.Т. и др. Внутриполостная химиотерапия рака яичников с использованием полимерных лекарственных комплексов. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 1991. – 23 с.

6. Ольшевский В.О. Комбинированные и кра-ниофасциальные резекции при злокачественных опухолях верхней челюсти. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 1991. – 21 с.

7. Пачес А.И., Любаев В.Л. Рак слизистой оболочки полости рта. – Опухоли головы и шеи. – М., 1997. – С. 171–2.

8. Попович В.И., Зырянов Б. Н., Кицманюк З. Д. и др. Интраоперационная лучевая терапия местнораспространенных опухолей головы и шеи. – Интраоперационная и электронная терапия опухолей головы и шеи. – Томск, 1999. – С. 89–101.

9. Черниченко В.А., Решетов И.В., Едемская О.В. Предварительные результаты использования интраоперационной лучевой терапии в лечении местнораспространенных опухолей головы и шеи // Материалы VI Всероссийского съезда онкологов. – Ростов, 2005. – С. 110.

10. Local control and complications after the use of electron beam intraoperative radiotherapy (EB-IORT) in high –risk head and neck patients. // The 6 intern. Congress For IORT. –S. Francisco, 1996.

11. Garret P., Rate W. IORT in Head and Neck Cancer with tongue invasive // IORT-94. – 5 th international Symposium: Abstract and Posters. – Lion, France, 1994. – P. 46.

12. Fruman S.B., Hamacer R. Management of advanced cervical metastasis using intraoperative radiotherapy // Laryngoscope. – 1999. – Vol. 106, № 6. – P.1999.

13. Nag S., Shuller D. Intraoperative high dose rate brachytherapy can be used to treat patients with previously irradiated head and neck recurrences at inaccessible sites // IORT-98. – I rst congress of the international society of intraoperative radiation therapy. – Pamplona, Spain, 1998. – P. 40.

14. Schmitt T., Portios C. Intraoperative radiotherapy for locally advanced oropharyngeal carcinomas: the Bellevue hospital // IORT-98. – I rst congress of the international society of intraoperative radiation therapy. – Pamplona, Spain, 1998. – P. 427.

Поступила 23.11.2006.