

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№4 Том 8 2009 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

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

Редакционный совет

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

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

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

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН
НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7 (495) 323 57 00, +7 (495) 324 10 65; факс: +7 (495) 324 22 74;
E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 8,25 усл.-печ. листов,
подписано в печать 04.12.2009
Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:
115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.
Тел. +7 (495) 324 24 70; ronc@list.ru

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

Принт-менеджмент:
Типография «Огни Москвы»
Тел.: +7 (494) 933-87-78
info@ognimsk.ru, www.ognimsk.ru

СОДЕРЖАНИЕ

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ:

Лазарев А.Ф., Шойхет Я.Н., Алексеева И.В. МНОГОФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ УЗЛОВОЙ ФОРМЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО РАКА ЛЕГКОГО	3
Титов К.С., Шубина И.Ж., Волков С.М., Родионова Л.М., Киселевский М.В. БИОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПЕРИКАРДИТОВ	9
Михайлова И.Н., Парсункова К.А., Евсегнеева И.В., <u>Краснова Л.Б.</u> , Барышников К.А., Черемушки Е.А., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Каравлов А.В., Киселев С.Л., Демидов Л.В., Барышников А.Ю. ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ХОДЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ АЛЛОГЕННЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ	13
Буравцова И.В., Калитин Н.Н., Саблина Ю.А., Какпакова Е.С., Карамышева А.Ф., Ставровская А.А., Голенков А.К. ЭКСПРЕССИЯ мРНК ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА СЕМЕЙСТВА VEGF И ИХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ: СОПОСТАВЛЕНИЕ С ЦИТОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ КОСТНОГО МОЗГА	17
Иниаков А.Н., Барышников А.Ю., Катаева Е.В., Трифонова Е.В., Голенков А.К. ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЛЮДАРАБИНА ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА	25
Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, А.Ф. Бацев, Е.К. Дворова, Е.Г. Матакин АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО И ТКАНЕВОГО ТИПОВ И ИХ ИНГИБИТОР PAI-1 В ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА: ВЗАИМОСВЯЗЬ С ОСНОВНЫМИ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ	29
Чекалова М.А., Камаева О.В., Махова Е.Е., Кузумова А.А. СЛУЧАЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛИ ВЛАГАЛИЩА	33

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ:

Славина Е.Г., Бигвава Х.А., Заботина Т.Н., Борунова А.А., Морозова Л.Ф., Черткова А.И., Нуртдинова В.А., Кадагидзе З.Г. МОДИФИКАЦИЯ ФАКТОРОМ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ (ФНО- α) ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И АПОПТОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВ В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА	37
Калинина О.В., Фролов Б.А., Штиль А.А., Перетолчина Н.М., Смирнова З.С. ВЛИЯНИЕ МИЛАЦИНА НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ МЕТОТРЕКСАТА НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС	45
Щербакова Э.Г., Бухман В.М., Исакова Е.Б., Лупатов Н.Н. СТИМУЛЯЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА СОЧЕТАНИЕМ НИЗКОДОЗОВОГО ЦИКЛОФOSФАМИДА С ПЕРОРАЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ ЛИЗОЦИМА И НУКЛЕРИНАТА НАТРИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	49
Гричева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Шмаров Д.А., Сарычева Т.Г., Боровкова Т.В., Найденкова Н.М., Саркисян Г.П., Тимофеев А.М., Колосова Л.Ю., Колошейнова Т.И., Ковалева Л.Г., Туркина А.Г. РАЗЛИЧИЯ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ P γ КЛЕТОК ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ХМЛ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ. I. ТРИ ТИПА P γ КЛЕТОК ПРИ ХМЛ. P γ КЛЕТКИ С ВЫСОКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ПРОЛИФЕРАЦИИ	53
Лебединская Е.А., Лосева Л.Ф., Гусин Д.Н., Ахматова Н.К., Семенова И.Б., Лебединская О.В. ВЛИЯНИЕ ВАКЦИНЫ Vp14 НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ	69
Ермакова К.В., Кубасова И.Ю., Борисова Л.М., Киселева М.П., Смирнова З.С., Меерович Г.А., Коган Е.А., Лукьянец Е.А., Ворожцов Г.Н. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ФОТОСЕНСОМ ГЛИБЛАСТОМЫ 101/8 КРЫС	73

ОБЗОРЫ:

Р.Р. Багиров, Б.Е. Полоцкий РАК ЛЕГКОГО У БОЛЬНЫХ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА	79
Шаназаров Н.А., Сабиров А.Х. РОЛЬ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ЕГО РЕЦЕПТОРА В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ	85
Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. КАРОТИНОИДЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ	91
Чан Тхи Хай Иен, Раменская Г.В., Оборотова Н.А. ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ХЛОРИНОВОГО РЯДА В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ	99
Масычева В.И., Белкина А.О. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕРМИДИНА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ	105
МАТЕРИАЛЫ VIII ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ»	36; 111

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

УДК616.24-006:616-079.4

*А.Ф. Лазарев, Я.Н. Шойхет, И.В. Алексеева***МНОГОФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
УЗЛОВОЙ ФОРМЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО РАКА ЛЕГКОГО**

Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул

Контактная информация:

Алексеева Ирина Викторовна, врач Алтайского филиала РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул

адрес: 656049, Барнаул, ул. Никитина, 77; **тел.** +7(3852)-63-26-20**e-mail:** aoc@ab.ru

Статья поступила 29.09.2009, принята к печати 01.10.2009.

Резюме

Несмотря на значительное усовершенствование методов диагностики различных заболеваний легких в последнее время сохраняются серьезные проблемы дифференциальной диагностики шаровидных образований, где частота ошибок достигает 50 %.

Авторами используется математический метод дискриминантного анализа [11; 14; 20] для дифференциальной диагностики периферического рака легкого. Чувствительность метода 95,1 %, специфичность – 95,0 %.

Ключевые слова: дифференциальная диагностика, дискриминантный анализ, поле диагнозов.*A.F. Lazarev, Y.N. Shoykhet, I.V. Alekseeva***MULTIFACTOR ANALYSIS IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF NODULAR FORM
OF PERIPHERAL LUNG CANCER**

Altai branch of Russian N.N. Blokhin Cancer Research Center of RAMS, Barnaul

Abstract

The problem of differential diagnostics of globe-shaped formations in lung remains unsolved, the frequency of diagnostic pitfalls runs up to 50 %.

In this study math-based method of discriminant analysis was used to diagnose the peripheral lung cancer. This approach increases the sensitivity of diagnosis up to 95,1 %, the specificity up to 95,0 %.

Key words: differential diagnostics, discriminant analysis, area of diagnosis.**Введение**

Периферический рак легкого продолжает оставаться актуальной проблемой онкологической науки в связи с высоким уровнем заболеваемости и смертности населения. Ежегодно в России заболевают раком легкого свыше 63 000 человек, из которых мужчин свыше 53 000. Более 20 000 пациенты с диагнозом «рак легких» выявляются уже в III–IV стадии [9; 10; 17; 22; 23].

При формировании групп риска по периферическому раку легкого, который дает шаровидную тень на рентгеновских снимках, порой очень сложно и важно дифференцировать это заболевание от других болезней, которые также дают синдром шаровидных теней в легких, а именно: внелегочные метастазы, очаговый туберкулез в фазе инфильтрации, туберкуломы, инфильтративный туберкулез, дающий шаровидную тень, пневмония с очертаниями, приближенными к шаровидной тени [1–3; 5; 8; 13; 15; 16; 34; 35].

При метастатических опухолях легких с неизвестной первичной локализацией обследование больного должно быть полным и всесторонним. Нужно иметь в виду, что каждая злокачественная опухоль имеет свою среднюю частоту метастазирования в легкие, а также рентгенологические особенности.

Чаще всего [1; 19] метастазируют в легкие хорионэпителиома матки (55,4 % случаев), опухоли почек (35,6–70 % случаев), опухоли скелета, опухоли яичка (21,5 % случаев), меланома кожи (68 % случаев), рак щитовидной железы (4–70 % случаев), рак молочной железы (20–25 % случаев), рак яичников (10 % случаев), рак легкого (6 % случаев), рак толстой кишки (39 % случаев), рак желудка (2–32,8 % случаев).

Метастазы в легких в виде округлых теней небольших размеров, мало отличающиеся по величине друг от друга, дают РМЖ, рак желудка, рак щитовидной железы, меланома, злокачественные опухоли костей, рак толстой кишки, хорионэпителиома матки. Метастазы в виде округлых теней, значительно отличающиеся друг от друга по величине, могут быть обусловлены опухолями почек, яичек, хорионэпителиома матки, раком щитовидной железы, раком и саркомой матки. Метастазы в виде ракового лимфангита отмечаются при РМЖ и желудка [1; 19]. По данным различных авторов, частота метастазирования злокачественных опухолей в легкие варьируется от 6,5 до 30 % и более. В 70–90 % случаев метастазы располагаются в «плащевой» зоне легких [1; 8; 16; 19]. Клинические симптомы периферического рака легкого и метастазов в легкие из других органов в начальных этапах развития заболевания, как правило, скуднее и не имеют специфических проявлений.

Рентгенологическая картина схожа и даже компьютерная томография не позволяет провести правильную дифференциальную диагностику во всех случаях [4–6; 7; 8; 21; 24–27; 29; 30–33; 35].

Картина пневмоний с шаровидной инфильтрацией, которые встречаются одинаково часто у мужчин и женщин в любом возрасте, в начальной стадии заболевания также схожа с клиникой периферического рака легкого, трудно дифференцируется по рентгенограммам и флюорограммам от периферической опухоли [6–8; 13; 16; 18; 26; 27]. Очень важно при массовых скрининговых обследованиях дифференцировать на начальной стадии периферические раки легких от туберкулома; очагового и инфильтративного туберкулеза, которые также дают шаровидную тень, скудную клинику и являются довольно распространенными заболеваниями [2; 3; 12; 13; 16; 28].

Цель исследования

Разработка критериев формирования групп риска периферического рака легкого при синдроме шаровидных теней в легких для выявления периферического рака легкого с помощью интегральной оценки взаимосвязи экзо- и эндогенных факторов, рентгенологических данных корреляционного и дискриминантного анализа.

Материалы и методы

В основу работы положены данные о 1010 больных с шаровидными образованиями в легких (табл. 1).

Критерием включения пациентов в группу «заболевания периферическим раком легкого» служило наличие морфологически подтвержденного диагноза «рак легкого». Критерием исключения являлось отсутствие периферического рака при цитологическом и гистологическом исследовании.

Критерием включения пациентов в группу больных с очаговым туберкулезом, туберкулемой, инфильтративным туберкулезом служило установление выделения туберкулезной палочки, наличие положительной динамики после специфической (противотуберкулезной) терапии. Критерием исключения являлось наличие положительной динамики после неспецифической терапии.

Критерием включения пациентов в группу больных с метастазами внелегочного рака служили гистологическая верификация, летальный исход с результатами аутопсии.

Среди пациентов всех групп заболеваний легких преобладали мужчины (табл. 2); Возраст – преимущественно 60 и более лет (табл. 3). Возраст больных периферическим раком легкого варьировал от 40–49 лет до 60 лет и старше. В 50–59 лет процент больных среди женщин был выше, чем у мужчин, а в возрасте 60 лет и старше – наоборот.

У большинства больных с периферическим раком легкого были установлены III и IV стадии процесса. У 93 пациентов (37,8 %) с периферическим раком легкого диагноз был установлен на ранних стадиях. При гистологическом исследовании опухолей легких преобладала аденокарцинома. У большинства пациентов с периферическим раком легкого было проведено хирургическое лечение (164 человека – 66,6 %). У больных с внелегочными злокачественными образованиями и метастазами рака в легкие также преобладали лица в возрасте 60 лет и старше (без разницы полов). Возраст больных пневмонией варьировал от 18 до 60 лет и старше (максимальная группа).

Среди больных пневмонией во всех возрастных группах чаще встречались мужчины.

Большинство пациентов с очаговым туберкулезом и туберкулемой были в возрасте 40–49 лет (для мужчин) и 30–39 лет (для женщин). Во всех возрастных группах больных очаговым туберкулезом и туберкулемой преобладали мужчины. Возраст больных инфильтративным туберкулезом легкого варьировал от 20 до 60 лет и старше. Большинство в возрасте 20–49 лет, что было характерно и для мужчин. У женщин преобладавал возраст 30–49 лет. Образование в легких у 70,7 % больных выявлено при диагностическом процессе, а у 29,3% – при профилактическом обследовании. Из сопутствующей патологии статистически значимо чаще ($P < 0,05$) наблюдалась гипертоническая болезнь.

Результаты и обсуждение

Работа состояла из двух этапов:

I этап – внутригрупповое исследование (37 факторов и 640 вариантов значений);

II этап – межгрупповая дифференциальная диагностика (21 фактор).

В работе учитывались:

- эндогенные факторы;
- экзогенные факторы;
- клинические данные;
- рентгенологические данные.

Определяли относительный риск влияния факторов и их значений на формирование одной из групп заболеваний с выделением максимального и минимального рисков; рассчитывались коэффициенты корреляции ($r > 0,3$), имеющие прямую связь с формированием одного из диагнозов; вводились коэффициенты канонической и классифицирующей функций.

Статистически значимый высокий риск заболевания периферическим раком легкого был отмечен при следующих значениях эндогенных факторов:

- в возрасте 60 лет и старше у мужчин с массой тела 80–89 кг и ростом 150–159 см,
- у гиперстеников;

при следующих значениях экзогенных факторов:

- неудовлетворительном питании,
- у курящих пациентов,
- преимущественно у украинцев,
- у пенсионеров,
- в семейном положении – женат (замужем),
- у механизаторов;

при следующих клинических проявлениях:

- наличие кашля,
- отсутствии температуры,
- одышка, небольшие катаральные проявления,
- повышенная потливость,
- выраженные боли в грудной клетке;

при следующих рентгенологических факторах:

- овальная форма шаровидной тени,
- неправильности формы шаровидной тени,
- расположение в правом легком,
- расположение в верхних долях легких,
- размеры более 3 см,
- высокая интенсивность,
- фиброзированный легочный рисунок, окружающий шаровидную тень,
- нечеткость контуров шаровидной тени,
- неоднородность структуры,
- отсутствие включений в шаровидной тени,
- малая плотность,
- отсутствие дополнительной тени рядом с шаровидной тенью,
- наличие бугристости и узловатости шаровидной тени.

Таблица 1

Количественное соотношение пациентов с различными заболеваниями легких

Характер заболевания	Число больных (%)
Периферический рак	246 (24,4)
Метастазы рака в легкие	103 (10,2)
Пневмония	102 (10,1)
Ограниченные (малые) формы туберкулеза	368 (36,4)
Очаговый туберкулез	300 (29,7)
Туберкулемы	68 (6,7)
Инфильтративный туберкулез	191 (18,9)
Всего	1010 (100)

Таблица 2

Пол больных с синдромом шаровидной тени в легком

Патология	n больных (%)	В том числе		P
		Мужчины n больных (%)	Женщины n больных (%)	
Периферический рак	246 (100)	206 (83,7)	40 (16,3)	0,001
Метастазы рака в легкие	103 (100)	68 (66)	35 (34)	0,001
Пневмония	102 (100)	67 (65,6)	35 (34,4)	0,001
Ограниченные формы туберкулеза	368 (100)	298 (80,9)	70 (19,1)	0,001
Инфильтративный туберкулез	191 (100)	159 (83,2)	32 (16,8)	0,001
Всего	1010 (100)	798 (72,7)	212 (27,3)	–

Таблица 3

Возрастные группы больных периферическим раком легкого

Возрастные группы	n больных (%)	В том числе		P
		Мужчины n больных (%)	Женщины n больных (%)	
40–49	27 (11)	23 (11,2)	4 (10,0)	0,5
50–59	51 (20,7)	37 (17,9)	14 (35)	0,05
60 и старше	168 (68,3)	146 (70,9)	22 (55,0)	0,01
Всего	246 (100)	206 (100,0)	40 (100,0)	–

Статистически значимо выше риск возникновения метастазов в легкие наблюдался при следующих эндогенных факторах:

- у женщин, в возрасте 60 лет и старше,
- при росте 160–169 см,
- с массой тела 60–69 кг и ниже,
- у нормостеников;

при следующих экзогенных факторах:

- неудовлетворительное питание,
- курение,
- украинцы,
- по характеру труда – безработные,
- по семейному положению – вдова/не замужем (холостяк),
- по профессиональной вредности – социальная сфера;

при следующих клинических факторах:

- отсутствие кашля,
- выраженное недомогание,
- наличие температуры,
- небольшая одышка,
- выраженная слабость,
- отсутствие катаральных явлений,
- выраженные боли в грудной клетке;

при следующих рентгенологических факторах:

- эллипсоидная форма шаровидной тени,
- расположение тени в правом легком, преимущественно в нижней доле,
- правильная форма тени,
- размер шаровидной тени более 2 см,
- локально-усиленный легочный рисунок, окружающий шаровидную тень,
- четкие контуры шаровидной тени,
- отсутствие включений в шаровидную тень,
- высокая плотность шаровидной тени,
- отсутствие дополнительных теней рядом с шаровидной тенью,

– отсутствие бугристости, узловатости шаровидной тени.

Статистически значимо выше риск возникновения пневмонии наблюдался при следующих эндогенных факторах:

- у женщин,
- в возрастной группе до 20 лет,
- рост до 150 см,
- масса тела 90 кг и выше,
- у нормостеников;

при следующих экзогенных факторах:

- удовлетворительное питание,
- у некурящих,
- по национальности – казахи,
- умственный характер труда,
- семейное положение – вдова/не замужем (холостяк),
- периодически контактирующие с туберкулезными больными;

при следующих клинических факторах:

- наличие кашля,
- отсутствие выраженного недомогания,
- значительный подъем температуры,
- отсутствие одышки,
- выраженная слабость больных,
- проявления катаральных явлений,
- незначительная потливость пациента,
- отсутствие боли в грудной клетке;

при следующих рентгенологических факторах:

- шаровидная форма тени,
- локализация в правом легком,
- расположение в средней доле легкого,
- размере шаровидной тени более 1 см,
- тени средней интенсивности,
- с неизменным легочным рисунком возле шаровидной тени с довольно четкими ее контурами,
- однородность по структуре.

Статистически значимо выше риск возникновения очагового туберкулеза и туберкулем наблюдался при следующих значениях эндогенных факторов:

- у мужчин,
- в возрастных группах 30–39 лет, 40–49 лет,
- росте 150–159 см,
- массе тела до 60 кг;

при следующих значениях экзогенных факторов:

- удовлетворительное питание,
- по национальности – казахи,
- характер труда – физический,
- астеники,
- семейное положение – вдова/холостяк,
- работающие в социальной сфере
- лица, регулярно контактирующие с туберкулезом;

при следующих значениях клинических факторов:

- отсутствие кашля, недомогания,
- незначительное увеличение температуры,
- небольшая одышка,
- появление слабости,
- отсутствие катаральных явлений,
- повышенная потливость,
- отсутствие боли в грудной клетке;

при следующих значениях рентгенологических факторов:

- шаровидная форма тени,
- расположение тени в правом легком, преимущественно в нижних и верхних долях,
- неправильная форма шаровидной тени,
- размер до 1 см,
- высокая интенсивность,
- расположение на локально-усиленном легочном рисунке,
- четкость контуров тени,
- неоднородность структуры,
- наличие включений и дополнительной тени вокруг,
- высокая плотность,
- отсутствие бугристости, узловатости.

Статистически значимо выше риск возникновения инфильтративного туберкулеза наблюдался при следующих значениях эндогенных факторов:

- у мужчин,
- в возрастных группах до 49 лет,
- рост до 159 см,
- статистически значимое увеличение ОР при изменении массы тела при инфильтративном туберкулезе не выявлено.

ОР инфильтративного туберкулеза легких выше при следующих значениях экзогенных факторов:

- у курящих,
- по национальности – у русских,
- физический характер труда,
- у астеников,
- семейное положение – вдова/холостяк;

при следующих значениях клинических факторов:

- отсутствие кашля,
- недомогание,
- температура,
- одышка,
- слабость,
- катаральные явления,
- повышенная потливость у пациентов;
- боли в грудной клетке на риск инфильтративного туберкулеза не влияли;

при следующих значениях рентгенологических факторов:

- локализация шаровидной тени в правом легком,
- расположении ее в верхних долях,

- правильность формы шаровидной тени,
- размер тени более 1 см,
- неизменный легочный рисунок, окружающий шаровидную тень,
- нечеткости контуров шаровидной тени,
- неоднородность структуры тени,
- отсутствие включений в шаровидной тени и дополнительной тени рядом,
- отсутствие бугристости и узловатости шаровидной тени.

Для каждого заболевания определяющими были различные переменные признаки. Далее выбраны самые высокие коэффициенты корреляции и наиболее часто повторяющиеся значения этих факторов (21), так как они являются основными критериями для дифференциальной диагностики групп заболеваний между собой.

Коэффициенты корреляции рассчитывались по формуле:

$$r = \frac{a*d - b*c}{\sqrt{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}}$$

где a; b; c; d – количество случаев отдельных комбинаций разновидностей исследуемых явлений.

При данных коэффициентах корреляции статистические различия между группами составили $P < 0,05$ (табл. 4).

Далее был проведен дискриминантный анализ и получены факторы (10), имеющие статистическое значение при межгрупповой дифференциальной диагностике периферического рака легкого и дифференциально-диагностически значимых заболеваний легких (табл. 5).

Были введены коэффициенты функций классификации и получены центры распределений интегральных показателей в группах (рис. 1). Затем на основании дискриминантного анализа было построено поле диагнозов (рис. 2).

Результаты классификации (определения принадлежности обследованных лиц к той или иной группе) на основе дискриминантного анализа были проведены при чувствительности метода 95,1 % и специфичности 95 %.

В последнее время, несмотря на значительное усовершенствование методов диагностики различных заболеваний легких, сохраняются серьезные проблемы дифференциальной диагностики «шаровидных» образований.

Выводы

1. Многофакторный анализ позволяет добиться правильной постановки диагноза периферического рака легкого и дифференциально-диагностически значимых заболеваний легких у пациентов с определенным набором значений исследованных признаков и служить критериями дифференциальной диагностики данных заболеваний.
2. Применение математического метода многофакторного дискриминантного анализа с интегральной оценкой взаимосвязей экзо- и эндогенных факторов их сочетаний с рентгенологическими данными позволяет значительно улучшить дифференциальную диагностику легочных заболеваний. Чувствительность метода – 95,1 %, специфичность – 95,0 %.

Таблица 4

Значимые коэффициенты корреляции (r) всех исследованных вариантов значений факторов у пациентов с синдромом шаровидных теней в легких

Переменный признак	r при периферическом раке легких	r при метастазах в легкие	r при пневмонии	r при очаговом туберкулезе и туберкулема	r при инфильтративном туберкулезе
Узловатость тени	0,688	0,32	0,241	0,346	0,296
Бугристость тени	0,682	0,36	0,24	0,365	0,299
Контур тени	0,607	0,56	0,29	0,365	0,5
Питание	0,56	0,42	0,33	0,45	0,34
Конституция	0,55	0,41	0,34	0,41	0,33
Курение	0,52	0,41	0,33	0,41	0,32
Форма тени	0,515	0,4	0,32	0,41	0,31
Локализация	0,508	0,39	0,31	0,38	0,31
Размеры тени	0,449	0,38	0,31	0,37	0,49
Интенсивность тени	0,432	0,38	0,299	0,365	0,31
Легочной рисунок	0,426	0,37	0,34	0,55	0,49
Пол	0,42	0,5	0,32	0,46	0,39
Структура тени	0,414	0,58	0,3	0,585	0,48
Включения тени	0,412	0,36	0,29	0,29	0,48
Возраст	0,405	0,54	0,3	0,46	0,391
Распад в тени	0,394	0,34	0,24	0,561	0,298
Рост	0,393	0,46	0,35	0,46	0,35
Округлость тени	0,372	0,59	0,24	0,399	0,49
Кашель	0,37	0,35	0,36	0,337	0,294
Недомогание	0,351	0,35	0,31	0,55	0,293
Температура	0,337	0,34	0,39	0,51	0,293

Таблица 5

Коэффициенты функций классификации, с которыми исходные 10 показателей входят в две первые главные компоненты

Переменные признаки	Коэффициенты функций классификации	
	f1	f2
Возраст	-0,764	0,1218
Температура тела	0,4481	-0,0612
Узловатость шаровидной тени	0,1277	0,1566
Бугристость шаровидной тени	0,0546	-0,2461
Включения в шаровидной тени	-0,018	0,2434
Размеры шаровидной тени	0,0746	0,4907
Форма шаровидной тени	-0,1612	-0,7694
Контур шаровидной тени	-0,764	0,1218
Наличие дополнительной тени	0,2119	-0,052
Структура шаровидной тени	0,2462	-0,0289

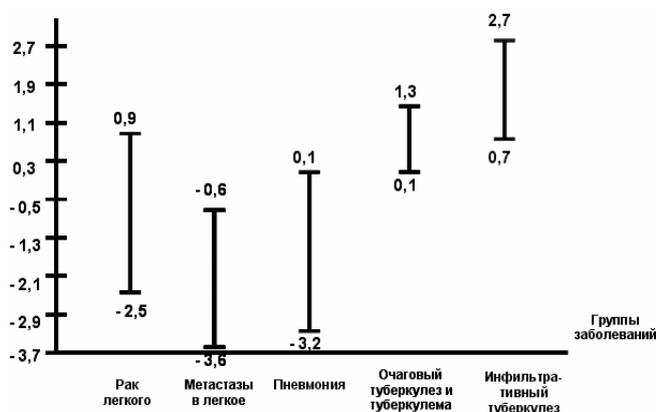


Рис. 1. Центроиды распределений интегральных показателей в группах.

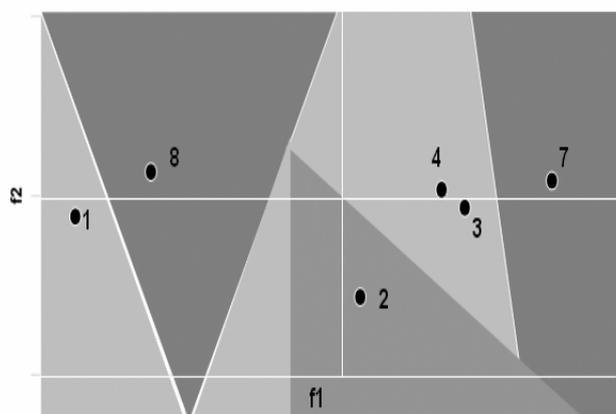


Рис. 2. Поле диагнозов: поле 1 (метастазы рака в легкие), поле 2 (пневмония с очертаниями) приближенными к шаровидной тени, поле 3 (очаговый туберкулез), поле 4 (туберкулема), поле 7 (инфильтративный туберкулез), поле 8 (периферический рак легкого).

Литература

1. *Ахмедов Б.П.* Метастатические опухоли. – М.: Медицина, 1984. – 186 с.
2. *Браженко Н.А., Браженко О.Н.* Фтизиопульмонология. – М.: Академия, 2006. – 368 с.
3. *Визель А.А., Гурылева М.Э.* Туберкулез: этиология, патогенез, клинические формы, диагностика, лечение. – М.: Гэотар Медицина, 1999. – 280 с.
4. *Габуня Р.И., Пирогов А.И., Пророков В.В. и др.* Компьютерная томография в диагностике рака легкого. В сб. статей: «Новые методы радиоизотопной диагностики в клинике». – Ташкент: Медицина, 1981. – С. 92–93.
5. *Гинсбург М.А., Киношенко Ю.Т.* Синдромная рентгенодиагностика заболеваний легких. – Киев: Здоров'я, 1987. – 144 с.
6. *Григоревич Н.А.* Перспективы скрининга злокачественных новообразований в XXI веке // Медицинские новости. – 2002. – № 11. – С. 9–13.
7. *Гуревич Л.А.* Рентгенологическая диагностика малого периферического рака легкого. Дисс. ... д-ра мед. наук. М., 1979. – 403 с.
8. *Давыдов М.И., Полоцкий Б.Е.* Рак легкого. – М.: Радекс, 2004. – 216 с.
9. *Двойрин В.В., Аксель Б.М.* Смертность от злокачественных новообразований населения России // Вопросы онкологии. – 1992. – Т. 38, № 12. – С. 1483–525.
10. *Двойрин В.В., Аксель Е.М., Трапезников Н.Н.* Статистика злокачественных новообразований в России и некоторых других странах СНГ в 1995 г. – М.: ОНЦ РАМН, 1996. – 125 с.
11. *Дронов С.В.* Многомерный статистический анализ: учебное пособие. – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2006. – 221 с. ISBN 5-7904-0472-3.
12. *Ерохин В.В., Земскова З.С.* Современные представления о туберкулезном воспалении. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 3. – С. 11–21.
13. *Красноборова С.Ю., Зенин Д.М.* О диагностике туберкулеза легких в учреждениях общей лечебной сети // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 7. – С. 21–4.
14. *Лазарев А.Ф., Петрова В.Д., Дмитрина Е.П. и др.* Опыт использования метода факторного анализа для формирования групп высокого онкологического риска // Материалы всероссийской научной конференции «Организационные вопросы ранней диагностики, профилактики злокачественных новообразований и паллиативной помощи онкологическим больным». – Казань, 2001. – С. 146–52.
15. *Лазарев А.Ф., Петрова В.Д.* Формирование групп онкологического риска (история вопроса) // Проблемы клинической медицины. – 2005. – № 1. – С. 112–8.
16. *Лурье А.М.* К дифференциальной диагностике периферического рака, эхинококка и туберкуломы легкого // Азербайджанский медицинский журнал. – 1965. – № 2. – С. 24–31.
17. *Мерабишвили В.Б., Дятченко О.Т.* Статистика рака легкого (заболеваемость, смертность, выживаемость) // Практическая онкология. – 2000. – № 3. – С. 6–8.
18. *Островский В.К., Асанов Б.М., Янголенко Д.В.* Некоторые показатели крови и лейкоцитарный индекс интоксикации при туберкулезе, пневмониях, абсцессах и раке легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 3. – С. 43–6.
19. *Рыбакова Н.И.* Рентгенодиагностика метастатических опухолей легких (по материалам Института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР): Дисс. ... д-ра мед. наук. М., 1964. – 314 с.
20. *Савилов Е.Д., Мамонтова Л.М., Астафьев В.А. и др.* Применение статистических методов в эпидемиологическом анализе. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 122 с.
21. *Фролова И.Г., Величко С.А., Усов В.Ю. и др.* Однофотонная эмиссионная компьютерная томография с Tc-99m-технетрилом (МИБИ) в диагностике рака легкого // Тез. докл., III Съезда МОО «Общество ядерной медицины». – Дубна, 2004. – С. 133–5.
22. *Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В.* Злокачественные новообразования в России в 2002 году. (Заболеваемость и смертность). – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2004. – 245 с.
23. *Шойхет Я.Н., Лазарев А.Ф., Агеев А.Г.* Рак легкого в Алтайском крае. – Барнаул: АГМУ РИО, 2006. – С. 5–53.
24. *Al-Sugair A., Coleman R.E.* Applications of PET in lung cancer // Semin Nucl Med. – 1998. – Vol. 28. – P. 303–19.
25. *Agusli C., Xaubet A., Monton C. et al.* The screening of lung cancer // Respir. Med. – 2001. – Vol. 95(10). – P. 822–8.
26. *Armato S.G. III, Li F., Giger M.L. et al.* Lung Cancer: Performance of Automated Lung Nodule Detection Applied to Cancers Missed in a CT Screening Program // Radiology. – 2002. – Vol. 225. – P. 685–692.
27. *Bach P.B., Kelley M.J., Tate R.C., McCrory D.C.* Screening for Lung Cancer: A Review of the Current Literature. Chest, January 1, 2003; 123(1 suppl). – P. 72–82.
28. *Diacon A.H., Van de Wal B.W., Wyser C. et al.* Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study // Eur Respir J. – 2003. – Vol. 22. – P. 589–91.
29. *Fotway M.B., Webb W.R.* CT for Lung Cancer Screening // Appl Radiol. – 2002. – Vol. 31(8). – P. 21–33.
30. *Heaschke C.I., Shaham D., Yankelovitz D.F., Altorki N.K.* CT Screening for Lung Cancer: Past and Ongoing Studies // Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2005. – Vol. 17(2). – P. 99–106.
31. *Jofre M.I., Massardo T., Gonzalez P. et al.* Use of positron-emission tomography with F18-fluorodeoxyglucose for the assessment of lung lesions suspicious of malignancy // Rev. Mee Chil. – 2005. – Vol. 133(5). – P. 583–92.
32. *Mulshine J.L.* New Developments In Lung Cancer Screening // J. Clin. Oncol. – 2005. – Vol. 23. – P. 3198–202.
33. *Ono K., Yoshitake T., Akahane K. et al.* Comparison of a digital flat-panel versus screen-film, photofluorography and storage-phosphor systems by detection of simulated lung adenocarcinoma lesions using hard copy images // Br J Radiol. – 2005. – Vol. 78(934). – P. 922–7.
34. *Urata A.* Prognostic factors in unresectable lung cancer // Nagoya Med. J. – 1993. – Vol. 37(2). – P. 71–94.
35. *Verschacklen J.A., Wever W., Bogaert J.* Role of Computed Tomography in Lung Cancer Staging // Crr Opin. Pulm. Med. – 2004. – Vol. 10(4). – P. 248–55.

УДК 616.11-006:615.37

*К.С. Титов, И.Ж. Шубина, С.М. Волков, Л.М. Родионова, М.В. Киселевский***БИОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПЕРИКАРДИТОВ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Киселевский Михаил Валентинович, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-27-94**e-mail:** kisele@inbox.ru

Статья поступила 20.10.2009, принята к печати: 03.10.2009.

Резюме

В 1996–2006 гг. в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 23 пациентам по поводу метастатического экссудативного перикардита была проведена внутривнутриперикардальная иммунотерапия с использованием рекомбинантного интерлейкина-2 («Ронколейкин» «Биотех», Россия) и аутологичных ЛАК-клеток, генерированных из лимфоцитов перикардального экссудата больных. Внутривнутриперикардальная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия у больных с метастатическим экссудативным перикардитом, показала высокую эффективность (95,7 %). Клинические эффекты ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии, обусловлены лизисом опухолевых клеток аутологичными лимфокин-активированными киллерами.

Ключевые слова: интерлейкин-2, ЛАК, опухолевый перикардит, иммунотерапия.*K.S. Titov, I.Zh. Shubina, S.M. Volkov, L.M. Rodionova, M.V. Kiselevsky***BIOTHERAPY OF MALIGNANT PERICARDITIS**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS

Abstract

23 patients underwent intra-pericardial immunotherapy of metastatic exudative pericarditis at the Institute of Clinical Oncology N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center from 1996 to 2006. The immunotherapy involved recombinant interleukin-2 ("Ronkoleukin", "Biothech", Russia) and autologous LAK-cells generated from lymphocytes of patients' pericardial effusion. Intra-pericardial IL-2/LAK immunotherapy in patients with metastatic exudative pericarditis showed high effectiveness (95,7 %). We suggest that the clinical effects of IL-2/LAK immunotherapy are determined by tumor cell lysis with autologous lymphokine activated killers.

Key words: interleukin-2, LAK, malignant pericarditis, immunotherapy.**Введение**

Одной из основных причин перикардитов (до 36%) являются метастазы злокачественных новообразований. Наиболее часто опухолевый перикардит возникает при раке легкого, что составляет примерно одну треть случаев, на втором месте следует РМЖ (25% случаев). Гемобластозы (15 % случаев) составляют треть по частоте группу больных с опухолевыми перикардитами [1; 5]. Злокачественный перикардальный выпот также наблюдается при злокачественной мезотелиоме, раке шейки матки и злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта [3; 10]. Опухолевый перикардит обычно возникает поздно и является следствием прогрессирования опухолевого процесса, поэтому редко манифестируется как первый признак онкологического заболевания. Эти пациенты, несмотря на плохой прогноз, нуждаются в лечении, поскольку почти в половине случаев перикардальный выпот может привести к тампонаде сердца [3; 7]. В настоящее время существует четыре основных метода лечения злокачественного перикардального выпота:

- перикардоцентез,
- внутривнутриперикардальная склеротерапия,
- системная химиотерапия, которая наиболее часто применяется для химиочувствительных опухолей,
- хирургическое лечение.

Выбор терапии обуславливают несколько факторов: общее состояние пациента, гемодинамические расстройства, доступность метода лечения, распространенность и гистологические особенности опухоли [5; 7; 9].

Основное показание к перикардоцентезу – угроза тампонады сердца, обусловленная накоплением жидкости в полости перикарда. Эта процедура имеет также важное диагностическое значение, особенно у пациентов без подтвержденного диагноза [2]. Больным с перикардальным выпотом проводится также перикардотомия, которая позволяет в ряде случаев предотвратить рецидивы [6; 10]. Данные о роли системной лекарственной терапии в лечении опухолевых перикардитов весьма ограничены, однако есть основания предлагать, что цитостатическая терапия может быть эффективной при химиочувствительных опухолях, например при лимфомах [7] и при раке молочной железы [3; 7; 10].

Несмотря на значительный опыт использования склерозирующих агентов в лечении злокачественных экссудатов, их применение у пациентов с опухолевыми перикардитами весьма ограничено [6]. Для инициации перикардального склероза использовались различные препараты, включая 5-фторурацил, блеомицин, митомицин С, тальк и радиоактивное золото.

Однако оценить эффективность трудно, потому что использование этих веществ было описано, как правило, в единичных случаях [4; 5; 6; 10].

Существует небольшое количество клинических исследований с использованием внутривнутриперикардиального введения цитокинов, прежде всего интерлейкина-2 и лимфокин-активированных киллерных клеток (ЛАК), выделенных из перикардиального экссудата больного. В частности, U. Toh [8] et al. на данных о 4 больных со злокачественным перикардиальным выпотом была продемонстрирована клиническая эффективность и хорошая переносимость данного метода. Единственным побочным эффектом была лихорадка 1 степени (по шкале ВОЗ). Эти клинические результаты позволяют предположить, что внутривнутриперикардиальная иммунотерапия может быть эффективна и безопасна при лечении опухолевых перикардитов.

Целью данного исследования являлась оценка клинической эффективности и безопасности применения внутривнутриперикардиальной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии при опухолевых перикардитах.

Материалы и методы

В 1996–2006 гг. в НИИ Клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 23 пациентам по поводу метастатического экссудативного перикардита была проведена внутривнутриперикардиальная иммунотерапия с использованием рекомбинантного интерлейкина-2 («Ронколейкин» «Биотех», Россия) и аутологичных ЛАК-клеток, генерированных их лимфоцитов перикардиального экссудата больных.

У 10 (43 %) больных перикардит был проявлением опухолевой диссеминации при немелкоклеточном раке легкого, у 9 (40 %) – при раке молочной железы и у 4 (17 %) был обусловлен прогрессированием рака яичников.

Исследуемая группа включала 14 женщин и 9 мужчин в возрасте от 35 до 70 лет, состояние которых к моменту проведения иммунотерапии у всех расценено как средней тяжести. До начала внутривнутриперикардиальной иммунотерапии все пациенты получали соответствующее комбинированное или комплексное лечение, как правило – хирургическое в комбинации с химио-, гормоно- или радиотерапией.

Перед началом иммунотерапии из полости перикарда удалялось 300–1000 мл серозного, серозно-геморрагического или геморрагического экссудата. Во всех 23 случаях до проведения иммунотерапии выполнялось цитологическое исследование перикардиального выпота.

Для проведения иммунотерапии полость перикарда под местной анестезией дренировалась и катетеризировалась на 7–10 дней. Для этой цели использовали набор «Плеврокан» (В. Braun, США). Перед введением препарата полость перикарда максимально осушалась. Ронколейкин вводился в пораженную полость перикарда по 0,5–1 млн. МЕ (0,5–1 мг) в 10 мл физиологического раствора на 1–5 и 8–9 сутки (суммарная доза – 5–7 млн. МЕ).

Генерированные из МЛ экссудативной жидкости и ресуспендированные в физиологическом растворе ЛАК-клетки вводили через установленный ка-

тетер в пораженную полость в дозе 110–150 млн. клеток (сумм. – 1 млрд. 100 млн. – 1 млрд. 500 млн. клеток) также на 1–5 и 8–9 сутки проводимого лечения. Контрольную эхокардиографию или УЗИ перикарда проводили после иммунотерапии, а также через 1 мес. и далее в динамике через каждые 3 месяца.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) из перикардиального выпота стабилизированного гепарином (25 ед/мл) проводили на градиенте фиколла (Sigma, США, $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$), центрифугированием при 400 g в течение 30 минут. МЛ, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и трехкратно отмывались в среде 199 (ПанЭко, Москва). После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. Полученные лимфоциты ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) в концентрации 500 000/мл и инкубировались с интерлейкином-2 (1000 МЕ/мл) («Ронколейкин», Биотех, Россия) при $t=37 \text{ }^\circ\text{C}$ и 5,0 % CO_2 в течение 3 суток для генерации ЛАК. Затем генерированные активированные лимфоциты использовали для внутривнутриперикардиального введения.

Определение экспрессии поверхностных антигенов МЛ и ЛАК проводили при помощи моноклональных антител (Caltag Laboratories, США) против соответствующих антигенов. Результаты учитывали методом проточной цитофлюорометрии на цитометре FACScan (Becton Dickinson, США). Определяли уровень экспрессии дифференцировочных антигенов CD16; CD25, CD38, HLA-DR; молекул адгезии CD58. Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 5000 событий в гейте. Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WINMDI 2.8.

Результаты и обсуждение

Цитологическое исследование проводилось до начала внутривнутриперикардиальной иммунотерапии, а также в конце лечения всем больным с перикардитами. В перикардиальном выпоте до лечения выявлялось, как правило, значительное количество опухолевых клеток и небольшое количество зрелых лимфоцитов (2-3 в поле зрения). В конце лечения у большинства больных опухолевые клетки отсутствовали, в экссудате опухолевые клетки обнаруживались только у 1 пациента с аденокарциномой легкого, не ответившего на такое лечение. При проведении внутривнутриперикардиальной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии полный эффект отмечен у 18 пациентов (78,1 %), частичный эффект (наличие небольшого количества жидкости в перикарде) у 4 (17,3 %). В 1 (4,3 %) случае зарегистрировано отсутствие эффекта.

Суммарная эффективность внутривнутриперикардиальной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии составила 95,4%. Повторное накопление выпота в перикарде отмечено у 2 (8,6%) больных в сроки от 6 до 12 месяцев после лечения (см. табл.).

Таблица

Клиническая эффективность внутривнутриперикардиальной иммунотерапии опухолевых перикардитов

Основной диагноз	n больных	Клинический эффект		
		Полный	Частичный	Без эффекта
Немелкоклеточный рак легкого	10 (43,5%)	7 (30,4%)	2 (8,7%)	1 (4,3%)
Рак молочной железы	9 (39,1%)	9 (40,1%)	1 (4,3%)	0
Рак яичников	4 (17,4%)	2 (8,6%)	1 (4,3%)	0
Всего	23 (100%)	18 (78,1%)	4 (17,3%)	1 (4,3%)

Внутриперикардиальная ИЛ-2/ЛАК-иммуно-терапия хорошо переносима и практически не вызы-вала у больных побочных эффектов, за исключе-нием явлений умеренной гипертермии, которая легко купировалась антипиретиками.

Для подтверждения факта активации лимфо-цитов проведено исследование субпопуляционного состава генерированных ЛАК, позволившее выявить увеличение активированных форм лимфоцитов (CD25⁺). Кроме того, данный метод позволяет уста-новить, что около 70% лимфоцитов составляют Т-клетки, 35% относятся к CD8⁺ (т.е. могут представ-лять цитотоксическую субпопуляцию), а 25% со-ставляют НК-клетки, которые играют важную роль в лизисе опухолевых клеток. Эти результаты указы-вают на то, что иммунотерапия приводит к активаци-и киллерного звена иммунитета.

Имунофенотип ЛАК, генерированных из МЛ перикардиального экссудата при инкубации их *ex vivo* в присутствии ИЛ-2, характеризовался повы-шенной экспрессией антигена натуральных киллеров CD16 и активационных антигенов CD25, CD38, а также антигена главного комплекса гистосовмести

II класса HLA-DR и молекулы адгезии CD58, по сравнению с уровнем экспрессии этих маркеров на интактных МЛ, выделенных из перикардиального выпота (рис. 1-2).

Таким образом, внутриперикардиальная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия, у больных с метастатиче-ским экссудативным перикардитом, показала высо-кую эффективность (95,7%).

Клинический эффект у всех больных под-тверждался эхокардиографией и ультразвуковым исследованием. Данный вид иммунотерапии был хорошо переносим и практически не вызывал по-бочных эффектов, за исключением умеренной тем-пературной реакции у некоторых пациентов. Кли-нические эффекты такой иммунотерапии, обуслов-лены лизисом опухолевых клеток аутологичными ЛАК. Учитывая высокую эффективность и хоро-шую переносимость, внутриперикардиальная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия при опухолевых перикарди-тах может рассматриваться как один из этапов ком-бинированного и (или) комплексного лечения больных с диссеминированными злокачественными новообразованиями.

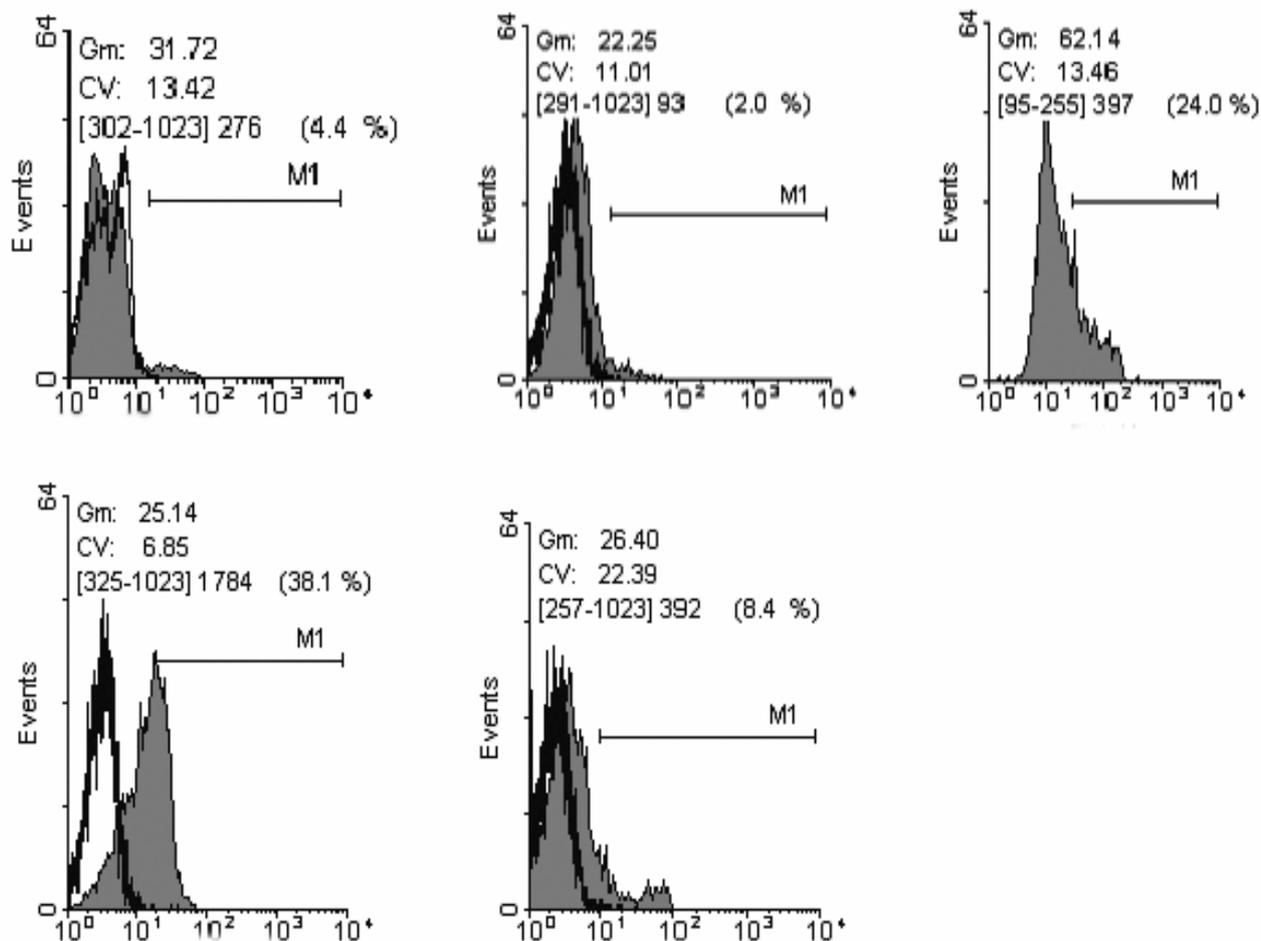


Рис. 1. Экспрессия поверхностных антигенов на лимфоцитах, выделенных из перикардиального экссудата:

Ось X – боковое светорассеивание (усл. ед.), ось Y – прямое светорассеивание (усл. ед.). Гистограммы, отражающие уровни экспрессии поверхностных маркеров, меченых МКА:

CD (clusters of differentiation) – дифференцировочные антигены;

HLA-DR – молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса;

Gm – средне-геометрическая отклонение сигнала;

CV – коэффициент вариации;

в квадратных скобках – регистрирующиеся каналы, после квадратных скобок – средний канал, в круглых скобках процент клеток, экспрессирующих данный антиген; линия M1 – уровень значений отличных от контроля.

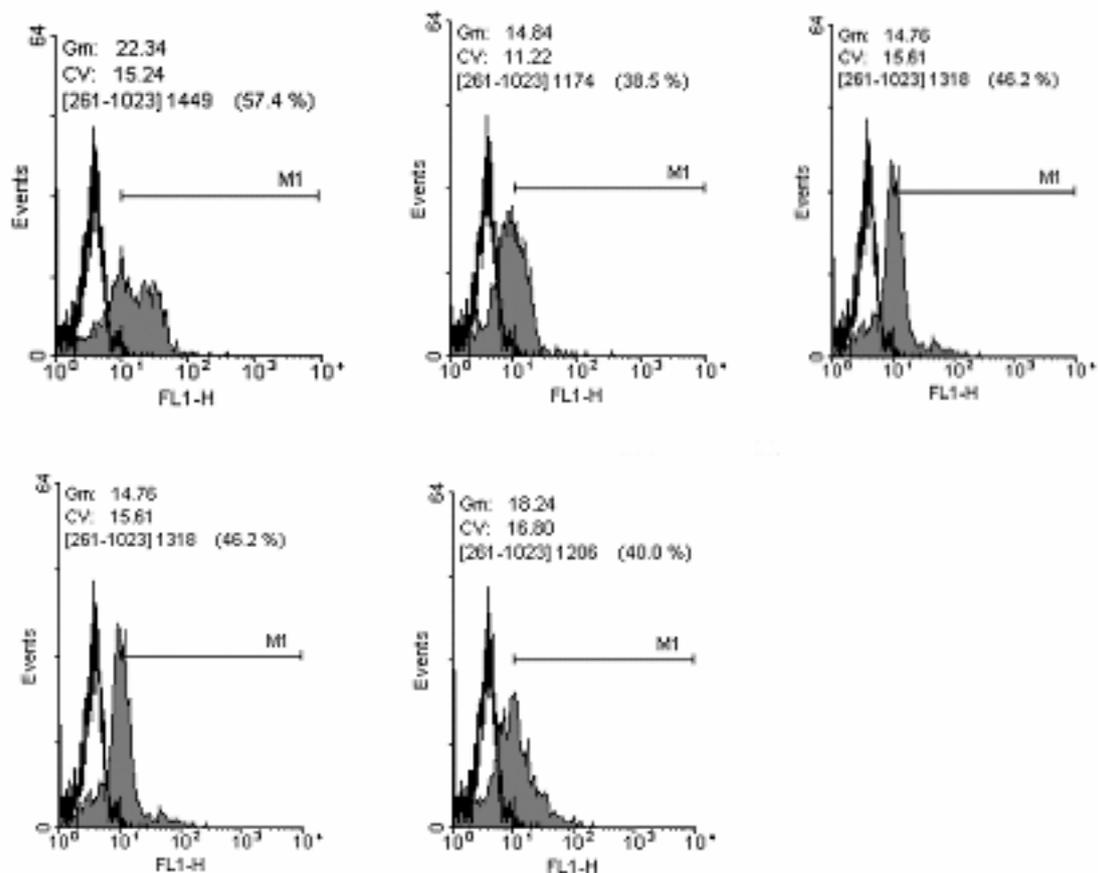


Рис. 2. Экспрессия поверхностных антигенов на лимфокин-активированных киллерах, генерированных из лимфоцитов, выделенных из перикардального экссудата.

Ось X – боковое светорассеивание (усл. ед.), ось Y – прямое светорассеивание (усл. ед.). Гистограммы, отражающие уровни экспрессии поверхностных маркеров, меченых МКА:

CD (clusters of differentiation) – дифференцировочные антигены;

HLA-DR – молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса;

Gm – средне-геометрическая отклонение сигнала;

CV – коэффициент вариации;

в квадратных скобках – регистрирующиеся каналы, после квадратных скобок – средний канал, в круглых скобках процент клеток, экспрессирующих данный антиген; линия MI – уровень значений отличных от контроля.

Литература

1. Buzaid A.C., Garewal H.S., Greenberg B.R. Managing malignant pericardial effusion // West J. Med. – 1989. – Vol. 150(2). – P. 174–9.
2. Cornily J.C., Pennec P.Y., Castellant P. et al. Cardiac tamponade in medical patients: a 10-year follow-up survey // Cardiology. – 2008. – Vol. 111(3). – P. 197–201.
3. Kainuma S., Masai T., Yamauchi T. et al. Primary malignant pericardial mesothelioma presenting as pericardial constriction // Ann Thorac Cardiovasc Surg. – 2008. – Vol. 14(6). – P. 396–8.
4. Kaira K., Mor M. Intrapericardial Instillation of Mitomycin C in Recurrent Cardiac Tamponade due to Malignant Pericardial Effusion // Clinical Oncology. – 2006. – Vol. 18(6). – P. 506.
5. Keane D., Jackson G. Managing recurrent malignant pericardial effusions // BMJ. – 1992. – Vol. 305. – P. 729–30.
6. Lestuzzi C., Lafaras C., Bearz A. Malignant pericardial effusion: sclerotherapy or local chemotherapy? // British Journal of Cancer. – 2009. – Vol. 101. – P. 734–5.
7. Maisch B., Karatolios K. New possibilities of diagnostics and therapy of pericarditis. // Internist (Berl). – 2008. – Vol. 49(1). – P. 17–26.
8. Toh U., Fujii T., Seki N. et al. Characterization of IL-2-activated TILs and their use in intrapericardial immunotherapy in malignant pericardial effusion // Cancer Immunol Immunother. – 2006. – Vol. 55(10). – P. 1219–27.
9. Vaitkus P.T., Herrmann H.C., LeWinter M.M. Treatment of malignant pericardial effusion // JAMA. – 1994. – Vol. 272(1). – P. 59–64.
10. Verleye L., Thomakos N., Edmondson R.J. Recurrent cervical cancer presenting as malignant pericarditis: case report and review of the literature // Eur J Gynaecol Oncol. – 2009. – Vol. 30(2). – P. 193–5.

УДК 616-006.81-085.371:616-097

И.Н. Михайлова¹, К.А. Парсункова², И.В. Евсегнеева³, Л.Б. Краснова³, К.А. Барышников¹, Е.А. Черемушкин¹, С. Субраманиан¹, Л.Ф. Морозова¹, О.С. Бурова¹, А.В. Караулов^{1,3}, С.Л. Киселев⁴, Л.В. Демидов¹, А.Ю. Барышников¹

ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ХОДЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ АЛЛОГЕННЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва.

²ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

³ММА им. И.М. Сеченова, Москва

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва

Контактная информация:

Парсункова Кермен Анатольевна, и.о. заведующей отделом клинической химии Государственное унитарное предприятие Международный научно-клинический медицинский центр «Интермедбиофизхим»

адрес: 107031, Москва г., ул. Рождественка, д.21; тел. +7(495)-623-31-16

e-mail: parsunkova@rambler.ru

Статья поступила 03.09.2009, принята к печати: 05.10.2009.

Резюме

В настоящей статье представлены результаты клинического исследования по вакцинотерапии меланомы с использованием аллогенных клеток, целью которого является изучение динамики цитокинов на фоне вакцинотерапии в терапевтическом режиме (после радикального хирургического вмешательства).

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

I.N. Mikhailova¹, K.A. Parsunkova², I.V. Evsegneeva³, L.B. Krasnova³, K.A. Baryshnikov¹, E.A. Cheromushkin¹, S. Subramanian¹, L.F. Morozova¹, O.S. Burova¹, A.V. Karaulov^{1,3}, S.L. Kiselev⁴, L.V. Demidov¹, A. Yu. Baryshnikov¹

THE DYNAMICS OF CYTOKINES EXPRESSION IN PATIENTS WITH DISSEMINATED MELANOMA DURING ALLOGENIC CELL BASED VACCINE TREATMENT

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

²«Intermedbiophyshem», Moscow

³I.M. Sechenov Moscow Medical Academy

⁴N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Moscow

Abstract

We conducted the clinical trial using allogenic cell based vaccine for melanoma treatment. Serum cytokines were evaluated in advanced melanoma patients and in patients after radical surgery.

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

Введение

В работах последних лет более пристально изучаются возможные воздействия на иммунную систему с помощью специфических противоопухолевых вакцин. Перспективным является разработка генно-инженерных противоопухолевых вакцин. Этот метод еще называют генотерапией рака. Генотерапия – это способ лечения, при котором функционирующий ген вводится в соматические клетки больного с целью исправления врожденных генетических нарушений или для придания клеткам новых биологических свойств, обеспечивающих благоприятный терапевтический эффект. Молекулярный носитель одного гена или комплекса генов, служащий для переноса в реципиентные клетки, называется вектором. Вектор может представлять собой просто фрагмент ДНК или РНК, или те же молекулы, включенные в липосомы или вирусный вектор [1].

Эффективность неспецифической противоопухолевой иммунотерапии как одного из методов лечения злокачественного процесса рассматривается уже не только с точки зрения непосредственных цитотоксических эффектов, но и с учетом иммуномодулирующих эффектов адьюванта антигенспецифических противоопухолевых вакцин. Выраженность таких эффектов зависит от многих парамет-

ров, характеризующих и сам вакцинный препарат, и клинико-биологические свойства опухоли, и состояние иммунной системы пациента с опухолью. Пока очевидно лишь то, что различные иммунокомпетентные клетки неоднозначно реагируют на одни и те же вакцины, что, вероятно, и определяет иммуномодулирующие эффекты [4]. Меланома считается иммунозависимой опухолью, поэтому для лечения используются препараты, влияющие на различные звенья специфического противоопухолевого иммунитета [2]. Одним из важных компонентов иммунного ответа является активация врожденной системы защиты организма. Одним из компонентов врожденной системы защиты организма является семейство белков Tag7/PGRP.

Tag7 – это секретируемый белок с хемокиновой активностью и способностью вызывать созревание дендритных клеток [3]. Зарубежными исследователями была показана важная роль tag7 в обеспечении врожденного иммунного ответа у насекомых. Этот ген был использован для генетической модификации клеток. Оказалось, что его экспрессия подавляет рост опухолевых клеток в организме и активизирует противоопухолевый иммунный ответ на повторное введение немодифицированных опухолевых клеток. Авторами в экспериментах было показано, что в противоопухолевый ответ вовлечены дендритные и Т-клетки [14].

Результаты I–II фазы клинических испытаний вакцинации пациентов клетками аутологичных или аллогенных опухолей, трансфицированными конструктами, экспрессирующими *tag7*, показали безвредность процедур, улучшение иммунного статуса, а также стабилизацию или частичную регрессию у 40 % пациентов с опухолями IV стадии после лечения всеми доступными методами [14].

Во время вакцинотерапии проводилось изучение динамики уровня цитокинов в сыворотке крови больных.

Цель исследования

Оценить динамику цитокинов Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ) и Th2 (IL-4, IL-10) в сыворотке крови у больных с диссеминированной меланомой кожи на фоне вакцинотерапии аллогенными опухолевыми клетками.

Материалы и методы

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аллогенных опухолевых клеток метастатической линии меланомы человека, трансфицированных *tag7*.

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.

В анализ включено 15 пациентов с регионарными и/или отдаленными метастазами (группа 1) и со стандартным лечением в анамнезе (хирургическое вмешательство, химиотерапия, иммунотерапия), на фоне которого отмечено прогрессирование заболевания, в связи с чем, пациенты получали вакцину в терапевтическом режиме.

Группу 2 (контрольная) составили 82 пациента с диагнозом «меланома кожи» без вакцинации на фоне химиотерапии.

Группу 3 (добровольцев, здоровых доноров) составили 13 доноров, сопоставимых по возрасту и полу с пациентами исследуемых групп.

Вакцина вводилась пациентам внутрикочно в дозе 10,0–50,0 10^6 клеток, в нескольких точках (2–10) в непосредственной близости от регионарных лимфатических коллекторов; интервалы между вакцинациями составляли 2 нед., курс 6 вакцинаций. Забор крови проводился до и через 12 нед. после вакцинотерапии. Материалом для исследования служила сыворотка крови.

Содержание IFN- γ , IL-2, IL-12 в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа («сэндвич»–вариант ИФА) на диагностических наборах фирмы «BenderMedSystems» (Австрия), а IL-4, IL-10 на коммерческих тест-системах ООО «Цитокин» (Россия). Автоматическое считывание и расчет концентраций производился на спектрофотометре Stat Fax (США) при λ 450 нм против референсной λ 620 нм.

Статистический анализ данных проводился при консультации в.н.с. Олимпиевой С.П. (кафедра медицинской кибернетики и информатики РГМУ) с использованием непараметрических критериев, не зависящих от характера распределения – точного метода Фишера и критерия « χ^2 », а также традиционно используемого в биомедицинских исследованиях t-критерия Стьюдента для нормально распре-

деленных переменных. Использовались следующие уровни значимости различий: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$. При проведении статистического анализа данных (проверка нормальности распределений показателей и др.) и формирования графиков использованы статистические пакеты EXCEL 2003 и STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

В начале вакцинотерапии исследовалось содержание IL-2 в сыворотке крови: у всех пациентов в исследуемой группе его уровень достоверно превышал значения такового в контрольных группах (табл. 1) и составил 24,38 pg/ml. По окончании вакцинотерапии аллогенными клетками отмечено достоверное повышение уровня IL-2 с 24,38 до 32,51 pg/ml.

До вакцинотерапии у больных в группе получающих аллогенную вакцину сывороточные концентрации IL-12 были несколько выше по сравнению с таковой в двух других группах и составили в среднем 112,25 pg/ml (табл. 2).

После лечения отмечено значительное повышение исследуемого цитокина в крови больных группы аллогенной вакцины с 112,25 до 173,97 pg/ml.

Таким образом, средний уровень IL-12 в крови больных исследуемой группы изначально был высоким и статистически достоверно повысился в 1,5 в процессе вакцинотерапии.

При анализе содержания IFN- γ в сыворотке крови до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, было ниже по сравнению с таковым в контрольной группе здоровых доноров и превышало значения контрольной группы без вакцинации (табл. 3).

В ходе лечения в группе больных с аллогенной вакциной отмечено снижение уровня интерферона с 34,71 до 26,85 pg/ml.

Таким образом, у больных, проходивших вакцинацию аллогенными клетками, трансфицированными *tag7*, уровень IFN- γ был схож с уровнем здоровых доноров, но в процессе вакцинации он снижался.

При анализе содержания IL-4 в сыворотке крови до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, было значительно выше и составило в среднем 12,05 pg/ml (табл. 4).

В ходе лечения отмечено значительное уменьшение IL-4 с 12,05 до 8,03 pg/ml.

Таким образом, у больных, проходивших вакцинацию аллогенными клетками, трансфицированными *tag7*, уровень IL-4 был значительно выше по сравнению с контрольными группами и статистически достоверно снижался в ходе вакцинотерапии.

При анализе содержания IL-10 в сыворотке крови до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, отмечено высокое значение интерлейкина-10 по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 5), которое составило в среднем 10,3 pg/ml.

В ходе лечения отмечалось уменьшение содержания IL-10 в группе больных с аллогенной вакциной с 10,3 до 8,54 pg/mL, однако, не имевшее статистически значимого подтверждения.

Таким образом, высокие значения уровней IL-2, IL-12, IL-4, IL-10 по сравнению с контрольными группами и напротив низкое содержание IFN- γ по сравнению с группой здоровых доноров до лечения у больных, получающих аллогенную вакцину, свидетельствует о существующем у них дисбалансе клеточного и гуморального звеньев иммунитета.

Таблица 1

Распределение IL-2 в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	24,38 14,34	32,51 21,1*
2. Контрольная	16,37 13,14	16,37 13,14
3. Доноры	1,13 0,39	1,13 0,39
Достоверность различий	p 0,001 1-2; 2-3	p 0,001 1-3; 2-3
	p 0,05 1-2	-

*p 0,05 в динамике вакцинотерапии

Таблица 2

Распределение IL-12 в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	112,25 36,23	173,97 95,41*
2. Контрольная группа	96,13 45,41	96,13 45,41
3. Доноры	100,63 35,34	100,63 35,34

*p 0,05 в динамике вакцинотерапии

Таблица 3

Распределение IFN-γ в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	34,71 19,57	26,85 11,69
2. Контрольная группа	14,84 10,69	14,84 10,69
3. Доноры	39,12 19,7	39,12 19,7
Достоверность различий	p 0,001 1-2; 2-3	

Таблица 4

Распределение IL-4 в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	12,05 9,45	8,03 4,32*
2. Контрольная группа	5,6 5,13	5,6 5,13
3. Доноры	1,93 1,22	1,93 1,22
Достоверность различий	p 0,05	1-3
	p 0,01	1-2
	p 0,001	1-3

*p 0,05 в динамике вакцинотерапии

Таблица 5

Распределение IL-10 в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	10,3 10,3	8,54 5,6
2. Контрольная группа	8,28 8,11	8,28 8,11
3. Доноры	4,89 1,78	4,89 1,78

Рядом авторов в исследованиях сыворотки крови пациентов с диссеминированной меланомой также подтверждается дисбаланс Th1/Th2 и низкое содержание уровня INF-гамма [9; 11; 17; 18; 20].

Имеющиеся в литературе данные по определению сывороточных уровней цитокинов у больных с меланомами кожи немногочисленны и весьма противоречивы.

Например, группа исследователей во главе с Z.R. Yurkovetsky по результатам мультифакторного анализа выявили изначально высокие значения IL-12, которые в ходе иммунотерапии снижались.

Результаты же группы L. Lauerova свидетельствуют о низком содержании IL-12 до лечения и дальнейшем его снижении, а по данным M.M. Barrio et al. медиана сывороточного IL-12 была ни-

же у прогрессирующих пациентов (61,6 pg/ml), по сравнению с пациентами без признаков заболевания (89 pg/ml) [5; 11; 20].

В то же время наше клиническое исследование показало, что на фоне вакцинотерапии аллогенными клетками происходит достоверное увеличение уровней IL-2, IL-12.

Уровни IL-4, IFN-γ у пациентов группы аллогенной вакцины в результате наших исследований снижались.

Однако, по данным Hui Li et al. при изучении влияния аллогенной вакцины обнаружено существенное повышение уровня Th1-типа цитокина (IFN-γ) после вакцинации, но при этом статистически значимого различия в уровнях Th2-типа цитокинов (IL-4) в ходе лечения не было обнаружено [10].

Концентрации IL-10 у пациентов на фоне терапии генно-инженерной вакциной, представленной опухолевыми клетками, трансфицированными *tag7* снижались. На сегодняшний день участие IL-10 в противоопухолевом иммунном ответе является спорным [8; 15]. Существует предположение о двойственной роли IL-10 в опухолевом микроокружении. Конституционно секретируясь опухолями, IL-10 играет две основных роли: усиление NK-клеточный киллинга опухолей, и, возможно, поглощение измененных опухолевых клеток АПК, а также ингибирование созревания АПК с последующим поддержанием способности поглощать антигены. Таким образом, IL-10 поддерживает хронический статус воспаления в опухолевом микроокружении и ингибирует восстановление и активацию адаптивного иммунитета [13].

Причиной повышения циркулирующего уровня IL-10 у больных с диссеминированной меланомой может быть его продукция клетками метастатической меланомы или опухолеассоциированными лимфоцитами [6; 12] и по данным W. Dummer и J. Nemunaitis et al. повышение уровня IL-10 как потенциального иммуносупрессивного цитокина ассоциируется с распространенной III-IV стадией меланомы [7; 16].

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. Барышников А.Ю. Биотерапия опухолей: неудачи и перспективы // Маммология. – 2007. – № 1. – С. 13–6.
2. Барышников К.А., Михайлова И.Н., Бурова О.С. и др. Оценка иммунного статуса при терапии геномодифицированной вакциной // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 4.
3. Киселев С.Л. Современная генная терапия: что это такое и каковы ее перспективы? // Пр. онк. – 2003. – Т. 4 (3) – С. 167.
4. Моисеев В.М., Балдуева И.А. Иммунологические аспекты опухолевого роста и возможности вакцинотерапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 5.
5. Barrio M.M., de Motta P.T., Kaplan J. et al. A phase I study of an allogenic vaccine (VACCIMEL) with GM-CSF in melanoma patients // Journal of Immunotherapy. – 2006. – Vol. 29(4). – P. 444–54.
6. Brady M.S., Eckels D.D., Lee J.S. Cytokine production by CD4+ T-cells responding to antigen presentation by melanoma cells // Melanoma Res. – 1999. – Vol. 9. – P. 173–80.
7. Dummer W., Becker J.C., Schwaaf A. et al. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma // Melanoma Res. – 1995. – Vol. 5. – P. 67–8.
8. Euv von E.M., Barrio M.M., Furman D. et al. A phase I clinical study of vaccination of melanoma patients with dendritic cells loaded with allogeneic apoptic/necrotic melanoma cells... // J Trans Med. – 2008. – Vol. 6. – P. 6.
9. Hersey P., Menzies S.W., Halliday G.M. et al. Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma // Cancer Immunol Immunother. – 2004. – Vol. 53(2). – P. 125–34.
10. Hui Li, Hong-Jing Jiang, Ming-Quan Ma et al. Vaccination with Allogenic GM-CSF Gene-Modified Lung Cancer Cells: Antitumor Activity Comparing with that Induced by Autologous Vaccine // Cancer Biotherapy@ Radiopharmaceuticals. – 2007. – Vol. 22(6). – P. 790–8.
11. Lauerova L., Dusek L., Simickova M. et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response // Neoplasma. – 2002. – Vol. 49(3). – P. 159–66.
12. Lazar-Molnar E., Hegyesi H., Toth S., Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma // Cytokines. – 2000. – Vol. 12(6). – P. 547–54.
13. Mocellin S., Panelli M.C., Wang E. et al. The dual role of IL-10 // Trends Immunol. – 2003. – Vol. 24. – P. 36–43.
14. Moiseyenko V.M., Danilov A.O. et al. Phase I/II trial of gene therapy with autologous tumor cells modified with *tag7/PGRP-S* gene in patients with disseminated solid tumors: miscellaneous tumors // Ann Oncol. – 2005. – Vol. 16(1). – P. 162–8.
15. Moore K.W., Malefyt R.W., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor // Annu Rev Immunol. – 2001. – Vol. 19. – P. 683–765.
16. Nemunaitis J., Fohg T., Snabe P. et al. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma // Cancer Invest. – 2001. – Vol. 19(3). – P. 239–47.
17. Porter G.A., Abdalla J., Lu M. et al. Significance of Plasma Cytokine levels in melanoma patients with histologically negative sentinel lymph nodes // Ann Surg Oncol. – 2001. – Vol. 8(2). – P. 116–22.
18. Schiltz P.M., Dillman R.O. Serum cytokines in metastatic melanoma patients treated with an autologous tumor vaccine // Cancer Biother Radiopharm. – 2003. – Vol. 18(6). – P. 879–86.
19. Segal B.M., Glass D.D., Shevach E.M. Cutting edge: IL-10-producing CD4+ T cells mediate tumor rejection // J. Immunol. – 2002. – Vol. 168. – P. 1–4.
20. Yurkovetsky Z.R., Kirkwood J.M., Edington H.D. et al. Multiplex Analysis of Serum Cytokines in Melanoma Patients Treated with Interferon- α 2b // Clin Cancer Res. – 2007. – Vol. 13(8). – P. 2423–8.

В то же время последние исследования продемонстрировали, что IL-10 продуцируемый CD4+ T-клетками способен проявлять сильный противоопухолевый эффект [19].

Выводы

1. В ходе нашего оригинального исследования подтверждено нарушение продукции различных цитокинов у больных, страдающих диссеминированной меланомой.
2. Высокие уровни сывороточных IL-2, IL-12, IL-4 и IL-10 и низкое содержание IFN- γ свидетельствуют о существующем выраженным дисбалансе соотношения Th1/Th2 у больных, страдающих диссеминированной меланомой.
3. Повышение уровней сывороточных IL-2, IL-12 и снижение IL-4 и IL-10 у пациентов на фоне терапии генно-инженерной вакциной, представленной собственными опухолевыми клетками, трансфицированными *tag-7*, свидетельствуют о выраженной активации Th1-типа иммунного ответа.

УДК 616-006.448:575.117.2:576.385.5

И.В. Буравцова¹, Н.Н. Калитин², Ю.А. Саблина², Е.С. Какпакова², А.Ф. Карамышева²,
А.А. Ставровская², А.К. Голенков¹

**ЭКСПРЕССИЯ мРНК ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА СЕМЕЙСТВА VEGF
И ИХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ:
СОПОСТАВЛЕНИЕ С ЦИТОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ КОСТНОГО МОЗГА**

¹МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Карамышева Аида Фуадовна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)324-17-69

e-mail: aikaram@yandex.ru

Статья поступила 09.06.2009, принята к печати: 05.10.2009.

Резюме

Экспрессия мРНК генов факторов роста эндотелия сосудов *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D* и их рецепторов *VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGFR3* в аспиратах костного мозга 33 больных множественной миеломой была сопоставлена с некоторыми цитологическими показателями (количеством плазматических клеток, соотношением количества лимфоцитов и плазматических клеток). У большинства исследованных больных сигнальные системы *VEGF-A/VEGFR1* и *VEGF-C/VEGF-D/VEGFR3* были независимыми, поскольку у них отсутствовала экспрессия мРНК гена *VEGFR2*, кодирующего общий для изучаемых факторов роста рецептор. Показано, что в группах больных, у которых выявлена коэкспрессия генов, кодирующих мРНК факторов роста и рецепторов как *VEGFR1*-, так и *VEGFR3*-зависимых сигнальных систем, снижено количество плазматических клеток и повышен показатель соотношения количества лимфоцитов и плазматических клеток.

Ключевые слова: множественная миелома, экспрессия генов, факторы роста эндотелия сосудов (VEGF), рецепторы факторов роста эндотелия сосудов (VEGFR).

*I.V. Buravtsova¹, N.N. Kalitin², Yu.A. Sablina², E.S. Kakpakova², A.F. Karamysheva²,
A.A. Stavrovskaya², A.K. Golenkov¹*

**VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTORS
AND THEIR RECEPTORS GENE EXPRESSION IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS:
COMPARISON WITH THE BONE MARROW CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS**

¹M.F. Vladimisky Moscow Regional Research Clinical Institute

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

Abstract

Vascular endothelial growth factors *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D* and their receptors *VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGFR3* gene expression in bone marrow aspirates of 33 multiple myeloma patients was compared with several cytological characteristics (the quantity of plasma cells, the lymphocytes/plasma cells ratio). The *VEGF-A/VEGFR1* and *VEGF-C*, *VEGF-D/VEGFR3* signal systems were independent in most patients studied because of the absence of *VEGFR2* gene expression, coding the common for the two signal systems receptor. The reduced number of plasma cells and the higher lymphocytes/plasma cells ratio in groups of patients which are characterized by co-expression of genes coding growth factors and receptors for both signal systems studied were found.

Key words: multiple myeloma, gene expression, vascular endothelial growth factors (VEGF), vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR).

Введение

Множественная миелома – это лимфопротеративное заболевание, при котором происходит злокачественная пролиферация клона плазматических клеток в костном мозге, сопровождающаяся секрецией моноклонального иммуноглобулина. Плазматические клетки образуются в результате нормального В-клеточного лимфопоэза. В периферических лимфоидных органах происходит активация и клональная пролиферация В-клеток, часть которых дифференцируется в короткоживущие плазматические клетки (продуцирующие в основном IgM), а часть – в центробласты. В зародышевом центре лимфоузла В-клетки претерпевают несколько изменений, в том числе изотипическое переключение с синтеза ранее продуцируемого IgM на синтез IgG, IgA, IgD или IgE [1; 7].

Множественная миелома – медленно пролиферирующая опухоль. Плазматические клетки находятся в основном в G₀ фазе клеточного цикла, а в S-фазе находится лишь 1-3%.

Ответ на лечение, длительность фазы терапевтического плато и выживаемость больных с множественной миеломой зависят от пролиферативной активности плазматических клеток [3]. При низком пролиферативном индексе ответ на лечение появляется медленнее, но фаза терапевтического плато и выживаемость дольше. При высоком (>3 %) – наоборот. По имеющимся литературным данным, активность течения множественной миеломы также коррелирует с процентом плазматических клеток в костном мозге (< или >10 %), с их морфологией и др. показателями. В образцах нормального костного мозга плазматических клеток очень мало.

Известно, что плазматические клетки секретируют один из важнейших ангиогенных факторов – фактор роста эндотелия сосудов VEGF [2], а также рецепторы VEGFR1 [9], VEGFR2 (в незначительной степени) [9], и VEGFR3 [11]. С другой стороны, стромальные клетки (стволовые клетки гематопоэза, фибробласты, остеобласты/остеокласты, клетки эндотелия и их предшественники), составляющие микроокружение плазматических клеток, секретируют взаимодействующие с рецептором VEGFR3 факторы роста VEGF-C и VEGF-D [11].

Таким образом, экспрессия факторов роста семейства VEGF и их рецепторов самими плазматическими клетками и их микроокружением в комплексе может обеспечивать как аутокринную (за счет взаимодействия VEGF-A с рецептором VEGFR1), так и паракринную (через взаимодействие VEGF-C и VEGF-D с рецептором VEGFR3) стимуляцию размножения плазматических клеток.

Сравнение некоторых показателей ангиогенеза у больных ММ и пациентов с моноклональной гаммапатией с неопределенной значимостью (MGUS) показало, что существует корреляция между активностью ангиогенеза и прогрессией этого заболевания. Иммуногистохимическое окрашивание биопсий костного мозга выявило, что у пациентов с ММ увеличено количество капилляров по сравнению с больными MGUS.

Уровень ангиогенной активности плазматических клеток пациентов с ММ также оказался повышенным [12; 13]. Повышенное количество капилляров в биопсиях костного мозга пациентов с ММ связывают также с плохим прогнозом, оцениваемым такими клиническими показателями как общая продолжительность жизни и продолжительность периода жизни без рецидивов [8; 10]. Все эти данные в целом указывают на важную роль оценки уровня ангиогенной активности у пациентов с ММ.

Основная задача нашей работы состояла в оценке уровня активности генов, кодирующих основные факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) и их рецепторы (VEGFR) у больных множественной миеломой на стадии постановки диагноза и сопоставлении этих данных с некоторыми цитологическими характеристиками с целью выделения групп больных, различающихся по этим показателям. В работе исследовалась экспрессия мРНК генов *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGFR1*, *VEGFR2* и *VEGFR3*, а также гена *VEGFR1s*, кодирующего растворимую форму рецептора VEGFR1, в аспиратах костного мозга, полученных от пациентов с ММ.

Результаты сопоставлялись с такими цитологическими характеристиками аспиратов костного мозга как количество плазматических клеток и соотношение количества лимфоцитов и плазматических клеток.

Материалы и методы

В работе исследовались данные о группе из 33 больных (15 мужчин и 18 женщин), у всех пациентов была диагностирована множественная миелома III стадии (табл. 1). Возраст пациентов составлял от 37 до 75 лет. Диагноз «множественная миелома» устанавливался на основании плазмоклеточной инфильтрации костного мозга, иммунохимического исследования сыворотки крови и мочи, рентгенологических данных. Стадирование на момент диагностики проводили по общепринятой системе Durie B.G.M. и Salmon S.E. [5]. Класс и тип легких цепей патологического иммуноглобулина (PIg) был опре-

делен у 27 пациентов. Иммунохимическая характеристика PIg установила, что у 11 пациентов секретируется PIg G kappa (Gκ), у 3 пациентов – PIg G lambda (Gλ), у 5 пациентов – PIg G kappa/Bj kappa (Gκ/Bjκ), у 1 пациента – PIg Bj lambda (Bjλ), у 2 пациентов – PIg G lambda/Bj lambda (Gλ/Bjλ), у 2 пациентов – PIg A lambda (Aλ), у 2 пациентов – PIg A kappa (Aκ) и у одного пациента была определена секрета PIg M kappa (Mκ).

Выделение РНК из клеток костного мозга и электрофорез

Для исследования экспрессии генов у больных собирали костно-мозговой пунктат (аспират), из которого в дальнейшем выделяли РНК. С этой целью клетки костного мозга наслаивали на 3 мл Ficoll и центрифугировали при 1500 об/мин, 30 мин., после чего на границе раздела фаз отбирали мононуклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую плазматические клетки. Далее отобранные клетки переносили в пробирку с 8 мл раствора Эрла и пересаживали центрифугированием при 1500 об/мин, 10 мин. и отмывали в 2–3 мл раствора Эрла. К осадку клеток добавляли 1 мл тризола (Trizol, «Sigma», США). Процедура выделения РНК проводили согласно стандартному протоколу. Электрофорез выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле при 100 В в течение 30–40 мин. Качество выделенной РНК оценивали по наличию полос рибосомальной РНК. Концентрацию РНК определяли по оптическому поглощению при длине волны 260 нм.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Экспрессию мРНК генов, кодирующих факторы роста эндотелия сосудов VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D и рецепторы VEGFR1, VEGFR1s, VEGFR2 и VEGFR3, определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 4 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) (фирма «Литех», Россия), 2 мМ смеси dNTP («MBI Fermentas»), 2–4 ед. ингибитора РНКаз («MBI Fermentas»), 100 ед. обратной транскриптазы M-MuLV («MBI Fermentas»). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция – 42 °С, 50 мин; денатурация – 94 °С, 5 сек. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакцию смесь, содержащую: 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 2 мМ смеси dNTP («MBI Fermentas»); 2,5 мкл 10-кратного буфера с (NH₄)₂SO₄ («MBI Fermentas»), 25 мМ MgCl₂; 1 ед. Taq-ДНК полимеразы; H₂O до конечного объема 25 мкл; минерального масла – 30 мкл. Нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров приведены в табл. 2. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей схеме: денатурация – 94 °С, 10 сек; аннилинг – T_m, 10 сек; синтез – 72 °С, 20 сек. значения температуры T_m и количество циклов ПЦР для каждого из генов приведены в табл. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию β2-микроглобулина. Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2 %-ном агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры «Samsung CCTV LENZ».

Таблица 1

Цитологические характеристики больных множественной миеломой

№ п/п	Образцы аспиратов костного мозга	Тип Рlg	Кол-во лимфоцитов	Кол-во плазм. клеток (пл.кл.)	Соотношение кол-ва лимф./пл.кл.
1.	MM1	Gк	н.о.*	23,3	н.о.
2.	MM2	Ак	н.о.	22,8	н.о.
3.	MM3	Gк	н.о.	35,4	н.о.
4.	MM4	Gл/BJл	8,2	13,4	0,61
5.	MM5	Gл	12,0	22,2	0,54
6.	MM6	н.о.	н.о.	34,5	н.о.
7.	MM7	Gк	н.о.	44,0	н.о.
8.	MM8	Gк	8,6	85,8	0,10
9.	MM10	н.о.	н.о.	88,0	н.о.
10.	MM11	Gк/BJк	8,8	56,6	0,16
11.	MM12	н.о.	15,4	39,6	0,39
12.	MM13	Gк	н.о.	34,0	н.о.
13.	MM15	Mк	17,0	51,2	0,33
14.	MM17	Ак	5,4	60,6	0,09
15.	MM18	н.о.	10,2	56,0	0,18
16.	MM19	Gл	15,6	24,4	0,64
17.	MM23	Gк/BJк	12,6	31,0	0,41
18.	MM25	н.о.	11,2	23,0	0,49
19.	MM29	Gк/BJк	2,2	85,0	0,03
20.	MM34	Ал	20,0	25,0	0,80
21.	MM35	Gл/BJл	5,0	12,0	0,42
22.	MM36	Gк	25,0	50,8	0,49
23.	MM37	Gк/BJк	9,5	31,4	0,30
24.	MM38	Gк	6,0	53,4	0,11
25.	MM39	Gк	7,8	48,0	0,16
26.	MM40	BJл	8,1	25,2	0,32
27.	MM41	Ал	5,4	69,2	0,08
28.	MM44	Gл	9,4	43,6	0,22
29.	MM52	Gк	н.о.	37,0	н.о.
30.	MM57	Gк	6,2	69,0	0,09
31.	MM58	Gк	5,9	69,0	0,09
32.	MM62	н.о.	н.о.	22,0	н.о.
33.	MM64	Gк/BJк	5,0	87,8	0,06

н.о. – не определяли

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности специфичных праймеров к генам, размер продукта, температура отжига праймеров и количество циклов, используемых в ПЦР

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер продукта, пары оснований	Температура отжига праймера	Кол-во циклов
VEGF-A	VEGF-F VEGF-R	5'-AGTGGTGAAGTTTCATGGATGTC-3' 5'-TGGTCTATCTTTCTTTGGTCTG-3'	295 п.о.	56°C	26
VEGF-C	VEGFc-F VEGFc-R	5'-CAGTTACGGTCTGTGTCCAGTGTAG-3' 5'-GGACACACATGGAGGTTTAAAGAAG-3'	300 п.о.	60°C	30
VEGF-D	Vd-F Vd-R	5'-TCCAGATCCCTGAAGAAGATCGCTG-3' 5'-ATGCTTTCACATGCTGTTTTCG-3'	387 п.о.	61°C	34
VEGFR1	FLT1-F FLT1-R	5'-CAGCTCCAAATATCTAGCTGTACC-3' 5'-GAGGACAAGAGTATGGCCTCTAAG-3'	436 п.о.	60°C	33
VEGFR1s*	sFLT1-F sFLT1-R	5'-GCACCTTGGTTGTGGCTGCTGAC-3' 5'-AATGTTTTACATTACTTTGTGTGG-3'	510 п.о.	62°C	35
VEGFR2	KDR-F KDR-R	5'-ATGGCCTCTTCTGTAAAGACACTCAC-3' 5'-AAGAAGGCTATTCCACAGTTGAAGTC-3'	556 п.о.	54°C	30
VEGFR3	FG-1s-F FG-3as-R	5'-CTTGTCCGGTACCGGCGTCATC-3' 5'-GAGGATCTTGAGCTCCGACATCAG-3'	366 п.о.	60°C	32
B2m	A3-F B3-R	5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3' 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	114 п.о.	59°C	22

*Нуклеотидная последовательность праймеров для гена VEGFR1s взята из статьи [4]

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка выполнена с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и OriginPro 7.5. Достоверность различий определялась с использованием непараметрического статистического критерия Манна-Уитни, различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В работе была исследована экспрессия мРНК генов семейства факторов роста эндотелия сосудов VEGF (*VEGF-A*, *VEGF-C* и *VEGF-D*) и их рецепторов VEGFR (*VEGFR1*, растворимой формы рецептора *VEGFR1s*, *VEGFR2* и *VEGFR3*) в мононуклеарной фракции клеток аспиратов костного мозга 33 больных ММ (см. табл. 1).

Общая характеристика экспрессии генов

Содержание мРНК каждого из исследованных генов колебалось у разных больных в широких пределах. Наиболее высокой была экспрессия *VEGF-A*, *VEGFR1* и *VEGFR1s*. мРНК *VEGF-A* была экспрессирована у всех исследованных больных, причем уровень ее экспрессии был достаточно высоким практически во всех образцах. мРНК *VEGFR1* и *VEGFR1s* была выявлена, соответственно, у 29/33 (88 %) и 30/33 (91 %) больных, при этом достаточно высокие уровни экспрессии мРНК *VEGFR1* наблюдались у 26/33 (79 %) больных, а мРНК *VEGFR1s* – у 19/33 (58 %) больных. Уровни экспрессии мРНК генов факторов роста *VEGF-C* и *VEGF-D* были более низкими, чем *VEGF-A*, и у значительной части больных (у 10/33 или 30 % для *VEGF-C* и у 12/33 или 36 % для *VEGF-D*) экспрессия этих генов в наших условиях не была обнаружена. мРНК гена рецептора *VEGFR3* также экспрессировалась на более низком уровне, чем генов *VEGFR1* и *VEGFR1s*, мРНК этого гена не обнаружена у 4/33 (12 %) больных, а мРНК гена *VEGFR2* была выявлена только у 3/33 (9 %) больных.

Отсутствие детектируемой мРНК гена, кодирующего этот рецептор, в мононуклеарной фракции клеток костного мозга большей части больных ММ указывает на то, что у этих больных сигнальные системы VEGF-A/VEGFR1 и VEGF-C, VEGF-D/VEGFR3 являются независимыми.

Рецептор VEGFR2 является единственным общим рецептором для всех 3 факторов роста VEGF-A, VEGF-C и VEGF-D, и в отсутствие этого рецептора фактор роста VEGF-A специфически связывается только с рецептором VEGFR1, а факторы роста VEGF-C и VEGF-D взаимодействуют только с рецептором VEGFR3. Таким образом, можно отдельно оценивать роль каждой из этих систем в размножении клеток, входящих в мононуклеарную фракцию, и в развитии заболевания. Сопоставление экспрессии генов с некоторыми цитологическими характеристиками аспиратов костного мозга больных множественной миеломой.

В качестве цитологических характеристик, с помощью которых оценивалось состояние больных, были выбраны такие показатели как количество плазматических клеток в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга и соотношение количества лимфоцитов и плазматических клеток. Численные значения выбранных характеристик колебались в значительных пределах. Так, количество плазматических клеток у различных больных составляло от

12 % до 88 %, а соотношение количества лимфоцитов и плазматических клеток – от 0,03 до 0,80 (см. табл. 1). Сопоставление между собой этих двух цитологических показателей выявило достаточно высокую степень корреляции между ними, описываемую экспоненциальной кривой с коэффициентом регрессии $R^2 = 0,798$ (рис. 1). Коэффициент отрицательной корреляции между этими показателями составил – 0,83. Таким образом, у больных с более высоким количеством плазматических клеток соотношение количества лимфоцитов и плазматических клеток снижено, что указывает на преимущественное размножение пула плазматических клеток.

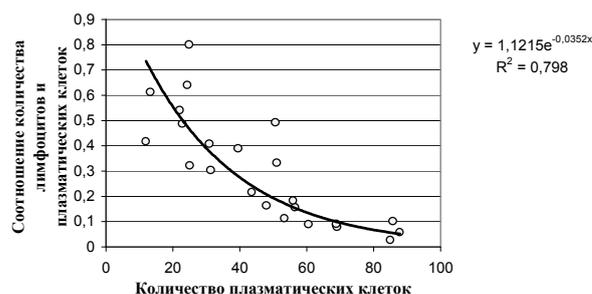


Рис. 1. Корреляция между количеством плазматических клеток и соотношением количества лимфоцитов/плазматических клеток: уравнение, описывающее полученную кривую; R^2 – коэффициент регрессии.

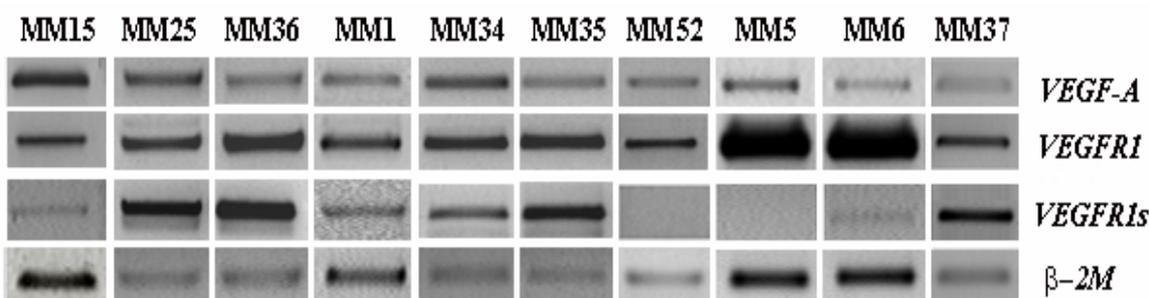
Коэкспрессия мРНК генов VEGF-A и VEGFR1

Коэкспрессия генов того или иного фактора роста и его рецептора свидетельствует в пользу того, что в клеточной популяции может функционировать аутокринная или паракринная стимуляция размножения клеток с участием этой системы. Мы сопоставили наличие или отсутствие коэкспрессии мРНК генов *VEGF-A* и *VEGFR1* с цитологическими характеристиками больных ММ. Для этого было выделено 2 группы больных, различающихся по содержанию мРНК *VEGF-A* и *VEGFR1* (рис. 2А-Б). Поскольку ген фактора роста *VEGF-A* был экспрессирован, в большей или меньшей степени, у всех больных, группы различались, в основном, по содержанию мРНК *VEGFR1*:

- в группу I вошли больные с высоким содержанием мРНК *VEGFR1* и *VEGF-A* (рис. 2А),
- в группу II вошли больные, у которых мРНК рецептора *VEGFR1* отсутствовала или ее количество было очень невелико (рис. 2Б).

Количества плазматических клеток и значения соотношения количества лимфоцитов и плазматических клеток у больных, вошедших в эти группы, приведены на рис. 3А-Б. При подсчете средних значений клинических показателей в этих группах оказалось, что в группе I несколько снижено среднее количество плазматических клеток и повышено среднее количество лимфоцитов (табл. 3). Показатель соотношения лимфоцитов и плазматических клеток в группе I оказался статистически достоверно выше, чем в группе II. Растворимая форма рецептора VEGFR1 (*VEGFR1s*) также связывается с VEGF-A, но поскольку эта форма не является трансмембранным рецептором, она не передает сигнал фактора роста в клетки эндотелия и фактически является конкурентным ингибитором рецептора VEGFR1. В нашем исследовании не было найдено корреляций между уровнями экспрессии гена *VEGFR1s* и генов *VEGFR1* или *VEGF-A*, также не было обнаружено корреляций между экспрессией этого гена и какими-либо клиническими показателями, исследовавшимися в нашей работе.

Группа I



Группа II

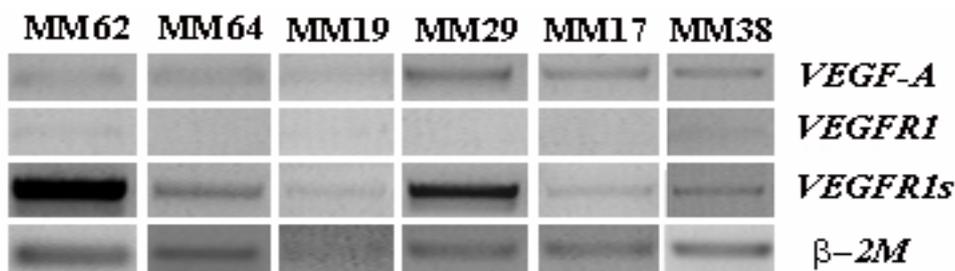


Рис. 2. Экспрессия генов фактора роста *VEGF-A* и его рецепторов *VEGFR1* и *VEGFR1s* в группах I и II: А – больные с высоким уровнем коэкспрессии генов *VEGF-A*, *VEGFR1* и *VEGFR1s*; Б – больные, у которых отсутствует коэкспрессия генов *VEGF-A*, *VEGFR1* и *VEGFR1s*.

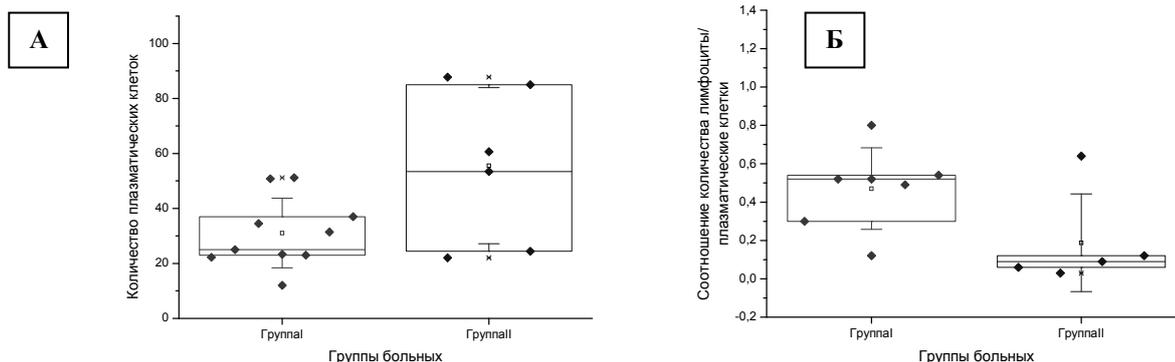


Рис. 3. Цитологические показатели в группах больных ММ, различающихся по уровню коэкспрессии мРНК *VEGF-A* и *VEGFR1*:

значения количества плазматических клеток (А) и соотношения количества лимфоциты/плазматические клетки (Б) у отдельных больных, медианы распределений и среднеквадратичные отклонения.

Группа I. Больные с высоким уровнем коэкспрессии; Группа II. Нет коэкспрессии.

Таблица 3

Сопоставление цитологических характеристик больных ММ в группах, различающихся по коэкспрессии мРНК генов *VEGF-A* и *VEGFR1*

Группы	Плазматические к-ки	Лимфоциты	Соотношение лимф./пл.кл.
I	31,04±12,68	14,24±6,82	0,48±0,17
II	55,53±28,40	6,84±5,11	0,19±0,25
Статистическая значимость	–	–	p < 0,05

Таблица 4

Сопоставление цитологических характеристик больных ММ в группах, различающихся по коэкспрессии мРНК генов *VEGF-C*, *VEGF-D* и *VEGFR3*

Группы	Плазматические к-ки	Лимфоциты	Соотношение лимф./пл.кл.
III	40,22±13,08	9,93±2,80	0,28±0,14
IV	67,17±20,61	7,28±2,89	0,14±0,13
Статистическая значимость	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,05

Однако можно отметить, что в группе из 4-х больных, характеризующихся наиболее высокими уровнями экспрессии генов *VEGF-A* и *VEGFR1*, экспрессия гена *VEGFR3* была несколько снижена.

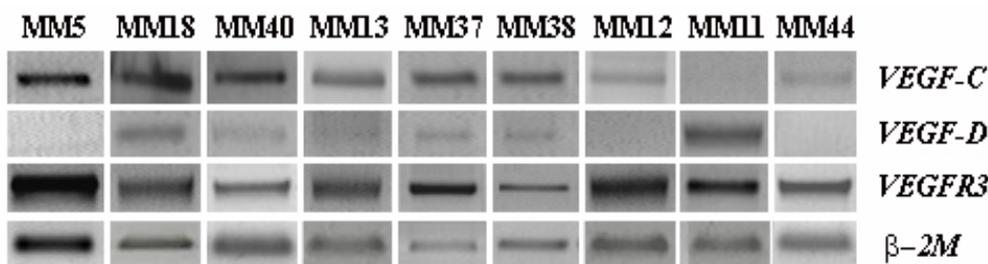
Сопоставление коэкспрессии мРНК генов *VEGF-C*, *VEGF-D* и *VEGFR3*

Для оценки возможной взаимосвязи между активностью сигнальной системы *VEGF-C*, *VEGF-D*/*VEGFR3* и клеточным составом аспиратов костного мозга пациентов с множественной миеломой, так же как и в случае с фактором роста *VEGF-A* и рецептором *VEGFR1*, все больные были разделены на 2 группы. В группу III вошли больные с высоким уровнем экспрессии мРНК гена *VEGFR3*, одновременно экспрессирующие мРНК хотя бы одного из факторов роста *VEGF-C* или *VEGF-D* (рис. 4 А); в группу IV вошли больные, у которых отсутствовала экспрессия мРНК либо гена рецептора *VEGFR3*, либо обоих взаимодействующих с этим рецептором факторов роста (рис. 4 Б). Количества плазматических клеток и значения соотношения количества лимфоцитов и плазматических клеток у больных, вошедших в эти группы, приведены на рис. 5А-Б.

Из данных, приведенных в табл. 4, видно, что в случае отсутствия коэкспрессии мРНК генов *VEGF-C*, *VEGF-D*/*VEGFR3* у больных повышено среднее количество плазматических клеток, снижено среднее количество лимфоцитов и более низкий показатель соотношения лимфоциты/ плазматические клетки. Все эти различия оказались статистически значимыми.

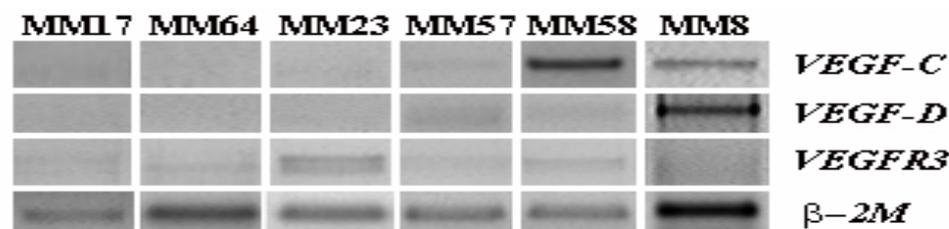
Представлялось интересным сравнить между собой по уровням экспрессии мРНК группы, характеризующиеся крайними значениями исследуемых цитологических характеристик. Так, мы выделили для сравнения группу больных, у которых количество плазматических клеток не превышает 25 (10 человек) и, группу, в которой это количество больше 60 (8 человек; табл. 5). Аналогично, для показателя соотношения количества плазматических клеток и лимфоцитов были выделены группы с показателем менее 0,1 (7 человек) и более 0,49 (8 человек; табл. 6). Прежде всего, можно отметить, что, как видно из данных, приведенных в табл. 5 и 6, в группу с высоким количеством плазматических клеток и в группу с низким показателем соотношения, за небольшим исключением, входят практически одни и те же больные.

Группа III



А

Группа IV



Б

Рис. 4. Экспрессия генов факторов роста *VEGF-C*, *VEGF-D* и их рецептора *VEGFR3* в группах III и IV: А – больные с высоким уровнем коэкспрессии генов *VEGF-C*, *VEGF-D* и *VEGFR3*; Б – больные, у которых отсутствует коэкспрессия генов *VEGF-C*, *VEGF-D* и *VEGFR3*.

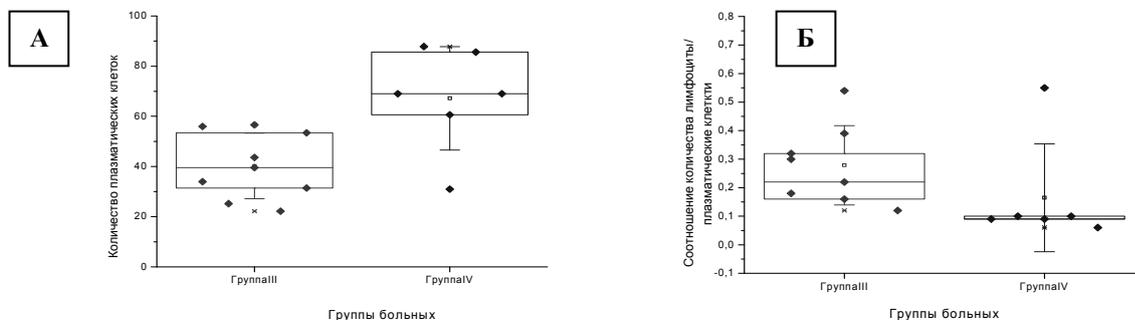


Рис. 5. Цитологические показатели в группах больных ММ, различающихся по уровню коэкспрессии мРНК *VEGF-C*, *VEGF-D* и *VEGFR3*: значения количества плазматических клеток (А) и соотношения количества лимфоциты/плазматические клетки (Б) у отдельных больных, медианы распределений и среднеквадратичные отклонения. Группа III. Больные с высоким уровнем коэкспрессии; Группа IV. Нет коэкспрессии.

Таблица 5

Группы больных с наиболее высокими и низкими показателями количества плазматических клеток

№ п/п	Количество плазматических клеток					
	> 60			< 25		
	Пациент	Группа	Плазматические к-ки	Пациент	Группа	Количество пл. кл.
1.	ММ8	IV	85,8	ММ1	I	23,3
2.	ММ10	–	88,0	ММ2	–	22,8
3.	ММ17	II, IV	60,6	ММ4	–	13,4
4.	ММ29	II	85,0	ММ5	III	22,2
5.	ММ41	–	69,2	ММ13	III	24,0
6.	ММ57	IV	69,0	ММ19	II	24,4
7.	ММ58	IV	69,0	ММ25	I	23,0
8.	ММ64	II, IV	87,8	ММ34	I	25,0
9.	–	–	–	ММ35	I	12,0
10.	–	–	–	ММ62	II	22,0

Таблица 6

Группы больных с наиболее высокими и низкими показателями соотношения количества лимфоцитов и плазматических клеток

№ п/п	Соотношение количества лимфоцитов и плазматических клеток					
	< 0,10			> 0,50		
	Пациент	Группа	Лимф./пл.кл.	Пациент	Группа	Лимф./пл.кл.
1.	ММ8	IV	0,10	ММ4	–	0,61
2.	ММ17	II, IV	0,09	ММ5	III	0,54
3.	ММ29	II	0,03	ММ15	I	0,52
4.	ММ41	–	0,08	ММ19	II	0,64
5.	ММ57	IV	0,10	ММ23	IV	0,55
6.	ММ58	IV	0,09	ММ25	I	0,52
7.	ММ64	II, IV	0,06	ММ34	I	0,80
8.	–	–	–	ММ36	I	0,49

Группы больных, характеризующихся относительно небольшими количествами плазматических клеток и низким показателем соотношения, совпадают наполовину (5 больных входят как в ту, так и в другую группу).

Из табл. 5 также видно, что 6/10 пациентов с низким количеством плазматических клеток (< 25) характеризуются высоким уровнем коэкспрессии мРНК генов (группы I или III). К этим же группам относятся 5/8 пациентов, у которых соотношение количества лимфоцитов и плазматических клеток 0,50 (табл. 6). И напротив, 6/8 пациентов с наиболее высоким количеством плазматических клеток характеризуются отсутствием коэкспрессии (группы II или IV). Аналогично, 6/7 пациентов с соотношением количества лимфоцитов и плазматических клеток 0,10 также относятся к группам II или IV.

Анализируемые в нашей работе клеточные составы мононуклеарных фракций клеток аспиратов костного мозга, полученные от больных множественной миеломой, представляют собой сложную смесь различных типов клеток, в состав которой наряду с клетками кроветворения входят также стромальные клетки (остеобласты, фибробласты, клетки эндотелия). Количество стромальных клеток очень невелико, не более 2 % от общего числа клеток, однако эти клетки могут играть важную роль в паракаринной регуляции размножения плазматических клеток. В работе Vassa A. et al. [11] авторы показали, что плазматические клетки преимущественно экспрессируют фактор роста VEGF-A (экспрессия факторов роста VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D была незначительна) и рецептор VEGFR3. В то же время стромальные клетки экспрессируют факторы роста VEGF-C и VEGF-D, а также рецепторы VEGFR2 (клетки эндотелия) и VEGFR1 (остаточные стромальные клетки). Из этих данных следует, что секретируемый плазматическими клетками VEGF-A может воздействовать на стро-

мальные клетки через взаимодействие с рецепторами VEGFR1 и VEGFR2, а стромальные клетки, в свою очередь, могут воздействовать на плазматические клетки, поскольку секретируемые ими факторы роста VEGF-C и VEGF-D взаимодействуют с рецептором VEGFR3, обнаруживаемым на плазматических клетках. В своей работе Vassa A. et al. показали: действительно, при добавлении к плазматическим клеткам кондиционированной среды, полученной при культивировании стромальных клеток, уровень включения ³H-тимидина плазматическими клетками существенно повышается. Аналогичный эффект наблюдался при добавлении к среде культивирования плазматических клеток факторов роста VEGF-C и VEGF-D, добавление же к среде антител к рецептору VEGFR3 снимает данный эффект. Таким образом, VEGFR3-зависимая сигнальная система играет важную роль в паракаринной регуляции размножения плазматических клеток.

Однако, аутокринная регуляция пролиферации плазматических клеток также возможна. В своей работе S. Kumar et al. [6], используя более чувствительный метод «гнездного» ОТ-ПЦР, показали, что плазматические клетки экспрессируют также и рецепторы VEGFR1 и VEGFR2; продемонстрирована активация STAT- и MAPK- сигнальных путей в некоторых линиях культивируемых клеток миеломы в ответ на их стимуляцию VEGF-A. В нашей работе доказано, что мРНК гена *VEGFR1* экспрессирована у подавляющего большинства пациентов с ММ (29 из 33), и уровень экспрессии был достаточно высоким. Напротив, мРНК гена *VEGFR2* была обнаружена лишь у 3 из 33 больных. Эти данные предполагают, что в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга большинства пациентов, вследствие отсутствия значимых уровней экспрессии мРНК гена, кодирующего общий для изучаемых факторов роста рецептор VEGFR2, VEGF-A- и VEGF-C/VEGF-D-зависимые сигнальные системы функционируют независимо.

При этом VEGF-A-зависимая система достаточно высоко активна у подавляющего большинства исследованных больных (29/33 или 87,87 %). Уровни экспрессии мРНК генов *VEGF-C*, *VEGF-D* и *VEGFR3* были относительно ниже, и эта сигнальная система была неактивна (вследствие отсутствия сигналов мРНК рецептора или обоих факторов роста) у 6/33 (18,18 %) пациентов.

Сравнение цитологических характеристик с уровнями экспрессии мРНК генов показало, что у больных с высоким уровнем активности VEGF-A-зависимой системы наблюдается относительно низкое количество плазматических клеток костного мозга, а количественное соотношение лимфоциты/плазматические клетки повышено.

Пациенты, у которых отсутствует коэкспрессия мРНК генов, кодирующих факторы роста и рецепторы обеих исследованных сигнальных систем (особенно, VEGF-C/VEGF-D-зависимой системы) характеризуются пониженным показателем соотношения количества лимфоцитов и плазматических клеток, т.е. баланс между клетками, образующимися в лимфоидном ростке, сдвинут в сторону плазматических клеток.

Из приведенных выше литературных данных известно, что плазматические клетки экспрессируют рецептор VEGFR3 и в таком случае увеличение количества плазматических клеток должно сопровождаться увеличением уровня экспрессии мРНК этого гена.

Однако в нашем исследовании наблюдается, скорее противоположная тенденция.

Отсутствие экспрессии мРНК *VEGFR3* у большинства больных с повышенным количеством плазматических клеток можно было бы объяснить возникновением на определенной стадии прогрессии активно пролиферирующего клона плазматических клеток, у которых экспрессия этого гена утрачена и, следовательно, регуляция их размножения осуществляется не VEGFR3-зависимой сигнальной системой, а какими-то другими регулирующими механизмами.

Заключение

Данные, полученные в нашей работе, свидетельствуют о том, что у большей части обследованных пациентов с множественной миеломой отсутствует экспрессия мРНК гена, кодирующего общий для факторов роста VEGF-A, VEGF-C и VEGF-D рецептор VEGFR2, и, следовательно, у них могут быть активны 2 независимые сигнальные системы: VEGF-A/VEGFR1 и VEGF-C, VEGF-D/VEGFR3.

При этом больные с высоким процентным содержанием плазматических клеток в аспиратах костного мозга характеризуются пониженным уровнем экспрессии мРНК генов, кодирующих факторы роста и рецепторы обеих сигнальных систем, по сравнению с теми пациентами, у которых количество плазматических клеток невелико.

Литература

1. *Bakkus M.H., Van Riet I., Van Camp B., Thielemans K.* Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. // *Br. J. Haematol.* – 1994. – Vol. 87. – P. 68–74.
2. *Bellamy W.T., Richter L., Frutiger Y. et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematological malignancies // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 728–33.
3. *Greipp P.R., Lust J.A., O'Fallon W.M. et al.* Plasma cell labeling index and β_2 -microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma // *Blood.* – 1993. – Vol. 81. – P. 3382–7.
4. *Gruemmer R., Motejlek K., Berghaus D. et al.* Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlt-1/sVEGFR1) expression and release in endothelial cells by human follicular fluid and granulose cells // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 57.
5. *Durie B.G.M., Salmon S.E.* A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival // *Cancer.* – 1975. – Vol. 36. – P. 842–54.
6. *Kumar S., Witzig T.E., Timm M. et al.* Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells // *Leukemia.* – 2003. – Vol. 17. – P. 2025–31.
7. *Kyle R.A.* The monoclonal gammopathies // *Clin. Chem.* – 1994. – Vol. 40(11). – P. 2154–61.
8. *Munshi N.C., Wilson C.* Increased bone marrow density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis // *Semin. Oncol.* – 2001. – Vol. 28(6). – P. 565–9.
9. *Podar K., Tai Y.T., Davies F.E. et al.* Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration // *Blood.* – 2001. – Vol. 98. – P. 428–35.
10. *Rajkumar S.V., Kyle R.A.* Angiogenesis in multiple myeloma // *Semin. Oncol.* – 2001. – Vol. 28(6). – P. 560–4.
11. *Vacca A., Ria R., Ribatti D. et al.* A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma // *Haematologica.* – 2003. – Vol. 88. – P. 176–85.
12. *Vacca A., Ribatti D., Presta M. et al.* Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma // *Blood.* – 1999. – Vol. 93. – P. 3064–73.
13. *Vacca A., Ribatti D., Roncali L. et al.* Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma // *Br. J. Haematol.* – 1994. – Vol. 87. – P. 503–8.

УДК 616-006.446.2-036.12:615.277.3.015.46:616-092.4

А.Н. Иншаков¹, Е.В. Катаева², Е.В. Трифонова², А.К. Голенков²**ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ *IN VITRO*
КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЛЮДАРАБИНА
ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА**¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва²МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва**Контактная информация:**

Иншаков Андрей Николаевич, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей.

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(495)-392-26-16, **моб.:** +7(926)-179-04-20**e-mail:** an-inshakov@yandex.ru

Статья поступила 02.06.2009, принята к печати 07.10.2009.

Резюме

Методом МТТ-теста *in vitro* определяли чувствительность к флюдарабину опухолевых лимфоцитов 14 первичных и 49 резистентных больных хроническим лимфолейкозом. Выявлено, что 61,2% резистентных больных чувствительны к препарату *in vitro*. Обнаружено, что лучшему клиническому эффекту соответствуют более низкие значения LD₅₀ при ПР 0,61±0,21 мкг/мл, ЧР 1,69±0,56 мкг/мл, СБ 3,5±1,3 мкг/мл и ПБ 10,21±6,5 мкг/мл. Анализ клинического ответа показал, что в группе чувствительных *in vitro* больных 82,4 % (n=17) ответивших на лечение, а в группе не чувствительных больных клиническая эффективность была достоверно ниже: 37,5 % (n=16) ответивших на лечение флюдарabiном (p<0,05).

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, МТТ-тест, резистентность, флюдарабин.A.N. Inshakov¹, E.V. Kataeva², E.V. Trifonova², A.K. Golenkov²**FLUDARABINE PHARMACODYNAMIC *IN VITRO*
AND ITS EFFECT IN PATIENTS
WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²M.F. Vladimirovsky Clinical Institute of Moscow Region, Moscow**Abstract**

We have used MTT assay to examine the effect of Fludarabine on lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia. 14 non-treated and 49 resistant patients with chronic lymphocytic leukemia were enrolled in this study. 61,2 % of patients responded to Fludarabine.

Here, we show that the low IC₅₀ is more effective in treatment of disease: IC₅₀ of the complete remission was 0,61±0,21 mkg/ml, the partial remission – 1,69±0,56 mkg/ml, the stabilization of disease – 3,5±1,3 mkg/ml, the progression of disease – 10,21±6,5 mkg/ml. In case of sensitivity toward Fludarabine, observed *in vitro* test 82,4 % patients (n=17) responded to treatment and only 37,5 % (n=16) patients responded in resistant group of patients. The data are statistically significant.

Key words: chronic lymphocytic leukaemia, MTT-assay, resistance, fludarabine.**Введение**

В последнее время в гематологии уделяется большое внимание проблеме лекарственной устойчивости, так как именно с этим связана неэффективность программной ХТ. В настоящее время данная проблема разрабатывается в следующих направлениях:

- изучение клинической эффективности новых противоопухолевых препаратов с различными механизмами действия;
- создание более эффективных химиотерапевтических программ на основе этих препаратов;
- высокодозная терапия с пересадкой аутологичных и аллогенных стволовых кроветворных клеток;
- применение модуляторов резистентности – препаратов, обладающих способностью подавлять механизмы, ответственные за развитие устойчивости.

Определение чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам при лейкозах *in vitro* так

же можно рассматривать как актуальное направление в преодолении устойчивости опухолевых клеток к цитостатикам. Применение пуриновых аналогов открыло новый этап в лечении хронического лимфолейкоза (ХЛЛ).

Появилась реальная возможность увеличить число полных ремиссий и выживаемость без прогрессии заболевания у первичных больных по сравнению с другими препаратами [6].

Необходимо учитывать, что 22–30 % первичных больных рефрактерны к флюдарабину [4]. Средние рефрактерных и рецидивных больных результаты лечения флюдарabiном хуже, частота достижения полной и частичной ремиссии ниже, чем в группе ранее не леченных пациентов [3].

По данным литературы, исследование чувствительности В-клеток больных ХЛЛ в культуре помогает прогнозировать ответ на терапию флюдарabiном [1; 2; 5; 6]. В связи с этим, представляется актуальным исследовать чувствительность В-клеток больных ХЛЛ к флюдарабину и сопоставить клинические и лабораторные данные.

Материалы и методы

В исследовании представлены результаты терапии 63 больных ХЛЛ, из них женщин – 26, мужчин – 37 в возрасте 43–78 лет (средний возраст 59,5 года). Из 63 исследуемых 49 проводилось предшествующее лечение программной полихимиотерапией. Вследствие этого у них развилась резистентность к проводимому ранее лечению. Резистентными считались больные, не ответившие на 2 курса ХТ. Исследование чувствительности опухолевых лимфоцитов к флюдарабину первичным больным проводили до лечения, а получавшим ранее терапию – не менее чем через 2 мес. после последнего курса. Выделение мононуклеарных клеток из цельной гепаринизированной крови осуществляли на градиенте плотности Ficoll-Paque или фиколл-верографин по общепринятому методу Bøijm. Для постановки МТТ-теста выделенные из периферической крови клетки скапывали в концентрации $2 \cdot 10^5$ в 180 мкл полной среды RPMI-1640 в 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar, USA). В каждую лунку добавляли 20 мкл исследуемого препарата в 5 концентрациях, каждую концентрацию ставили в триплете, максимальная концентрация в лунке составила 33 мкг/мл с шагом разведения 3.

Флюдарабин (Schering AG, Германия): флакон, содержащий 50 мг лиофилизированного препарата. Разводили 5 мл 0,9%-ного р-ра NaCl до конечной стоковой концентрации 10 мг/мл. Хранили в аликвотах по 0,04 мл при -20°C до использования. Теоретически рассчитанная терапевтическая концентрация флюдарабина в плазме (ТПК) составила 0,97 мкг/мл.

В контрольные лунки с клетками добавляли по 20 мкл чистой среды RPMI-1640. В качестве контроля среды использовали лунки, содержащие 180 мкл полной и 20 мкл чистой среды RPMI-1640. Планшеты с клетками инкубировали в течение 96 ч при 37°C в атмосфере 5%-ного CO_2 . Через 96 ч в планшет с клетками добавляли по 20 мкл МТТ (концентрации в PBS 5 мг/мл) в каждую лунку и инкубировали 5–6 ч при 37°C в атмосфере 5%-ного CO_2 .

После образования синих кристалов формазана планшеты центрифугировали при 2000 об/мин 7–10 мин, надосадочную жидкость удаляли. Осадок растворяли, добавляя в лунки по 150–200 мкл ДМСО. Планшеты помещали на 5–7 мин в термостат при температуре 37°C . Далее планшеты встряхивали на шейкере, после этого интенсивность окрашивания среды измеряли на спектрофотометре «Multiscan» при $\lambda=540\text{--}690$ нм, за *blank* принимали лунки, содержащие среду без клеток и препаратов. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Процент живых клеток вычисляли по формуле:

$$N_0 = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%, \text{ где}$$

- N_0 – процент живых клеток;
- N_1 – средняя оптическая плотность лунок, содержащих клетки и препарат;
- N_2 – средняя оптическая плотность контрольных лунок, содержащих только клетки.

Потом строили график зависимости «доза–эффект» и определяли LD_{50} (концентрация, которая вызывала гибель 50 % клеток). Клетки опухоли считались чувствительными к препарату, если значение LD_{50} было меньше ТПК.

Результаты и обсуждение

У 63 больных ХЛЛ было проведено скрининговое исследование чувствительности опухолевых клеток к флюдарабину МТТ-тестом. По нашим дан-

ным, В-лимфоциты 37 больных (58,7 %) оказались чувствительными, а 26 (41,3 %) – резистентны к флюдарабину. Часть обследованных больных составили ранее не леченные (первичные) 14 пациентов: в этой группе у 12 (85,7 %) опухолевые клетки были чувствительны, у 2 (14,3 %) устойчивы к действию флюдарабина *in vitro*. У остальных 49 была выявлена клиническая рефрактерность к проводимой ранее ХТ: опухолевые клетки 30 (61,2 %) больных были чувствительны, 19 (38,8 %) устойчивы к действию препарата (рис. 1). Как видно из проведенного скрининга, в группе рефрактерных больных ($n=49$) больше половины оказались чувствительны к флюдарабину. Это послужило основанием для изучения противоопухолевого эффекта флюдарабина у преимущественно резистентных больных.

В дальнейшем лечении этим препаратом было проведено 33 больным ХЛЛ, среди которых было 7 первичных, 26 рефрактерных к проводимому ранее лечению. Флюдарабин назначали в виде монотерапии по 25 мг/м² в течение 5 дней через 4-недельные интервалы. В зависимости от ответа на лечение больных разделили на две группы: отвечающие и не отвечающие на ХТ. Ответ должен был сохраняться не менее 2 мес. К отвечающим относили больных, достигших полной и частичной ремиссии, к не отвечающим – больных, у которых произошла стабилизация болезни или прогрессирование заболевания.

В результате проведенного лечения:

- у 33 больных ХЛЛ было достигнуто 11 полных (33,3 %) + 9 частичных ремиссий (27,3 %) = в совокупности 61 % ответивших,
- у 10 больных произошла стабилизация (30 %) + у 3 прогрессирование болезни (9,1 %) = не ответившие 39 %.

Результаты сопоставления данных чувствительности опухолевых клеток к флюдарабину в МТТ-тесте по LD_{50} у 33 больных с клиническими данными у этих же пациентов представлены на рис. 2. Средняя величина LD_{50} при полной ремиссии составила $0,61 \pm 0,21$ мкг/мл, частичной ремиссии $1,69 \pm 0,56$ мкг/мл, стабилизации болезни – $3,5 \pm 1,3$ мкг/мл и прогрессирование болезни – $10,21 \pm 6,5$ мкг/мл. Эти данные показывают, что лучшему клиническому эффекту соответствуют более низкие показатели LD_{50} . Были выявлены достоверные различия значений LD_{50} в группах ПР и СБ ($p < 0,05$), ПР и ПБ ($p < 0,05$), ЧР и ПБ ($p < 0,05$). Значение LD_{50} в группе больных, ответивших на лечение, было достоверно ниже и составило $1,1 \pm 0,3$ мкг/мл. В группе больных, не ответивших на лечение, значение LD_{50} было достоверно выше $5,1 \pm 1,8$ мкг/мл ($p < 0,01$; рис. 3).

При рассмотрении фармакодинамических кривых в группах больных, ответивших и не ответивших на лечение флюдарабином, получены следующие результаты. Фармакодинамическая кривая ответивших (ПР+ЧР) расположена более полого и ближе к оси ОХ, на которой отложены значения 5 концентраций флюдарабина, что отражает меньшее количество жизнеспособных клеток, оставшихся после культивирования с противоопухолевым препаратом. Фармакодинамическая кривая больных, не ответивших (СБ+ПБ) на терапию флюдарабином, расположена более круто и в точках 5 концентраций флюдарабина показывает большее количество жизнеспособных клеток. При увеличении концентрации более 11,1 мкг/мл отмечено приближение кривых друг к другу, что свидетельствует об одинаковой жизнеспособности клеток у больных, ответивших и не ответивших на лечение (рис. 4).



Рис. 1. Скрининг чувствительности к флюдарабину всех обследованных больных.

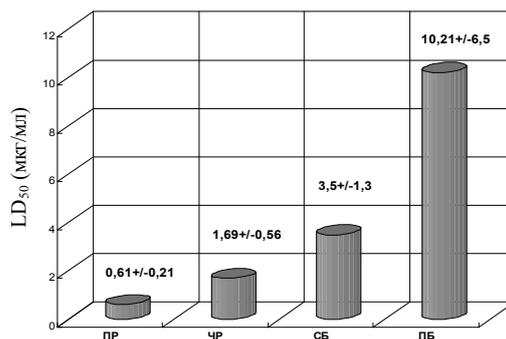


Рис. 2. Сравнение клинических результатов и величины LD₅₀ у больных ХЛЛ (n=33).

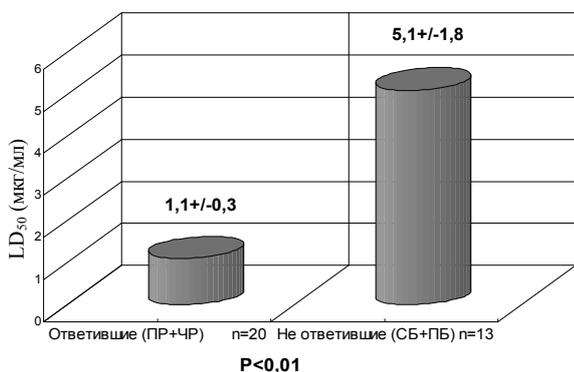


Рис. 3. Значения LD₅₀ в группах больных ХЛЛ, ответивших и не ответивших на лечение флюдарабинном (n=33).

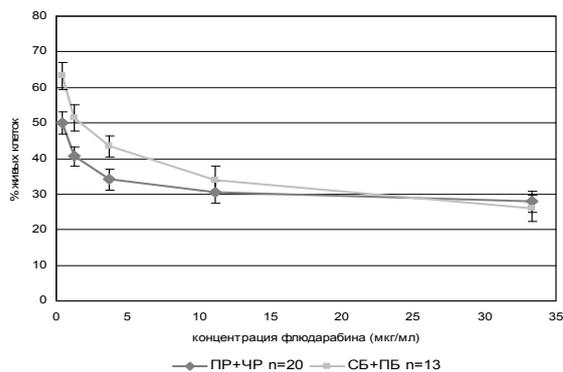


Рис. 4. Фармакодинамические кривые флюдарабина в культуре опухолевых клеток у 33 больных ХЛЛ *in vitro*.

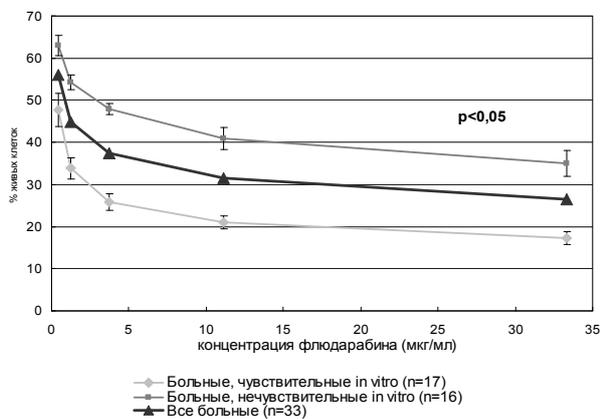


Рис. 5. Фармакодинамические кривые зависимости жизнеспособности опухолевых клеток от концентрации флюдарабина *in vitro*.

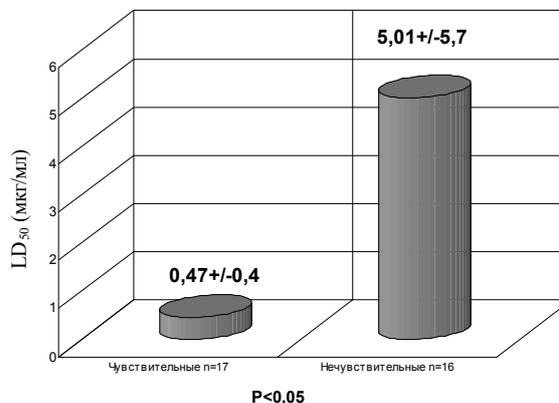


Рис. 6. Сравнение значений LD₅₀ в группах больных ХЛЛ чувствительных и нечувствительных к флюдарабину *in vitro* (n=33).

Таблица 1

Зависимость количества живых клеток от концентрации флюдарабина в МТТ-тесте

Клинический ответ	Концентрация флюдарабина <i>in vitro</i> , мкг/мл				
	0,41	1,23	3,7	11,1	33,3
	Количество живых клеток, %				
ПР+ЧР, n=20	50±3,1	40,6±2,7	34,1±3,0	30,5±3,0	27,9±3,0
СБ+ПБ, n=13	63,2±3,9	51,5±3,6	43,5±3,0	34±3,8	26,1±3,7
Достоверность	P<0,05	P<0,05	P<0,05		

В табл. 1 представлена цифровая зависимость количества живых клеток от концентрации флюдарабина в культуре. При концентрации флюдарабина в культуре 0,41; 1,23; 3,7 мкг/мл у больных, ответивших на лечение, количество живых клеток достоверно меньше, чем у пациентов, не ответивших на терапию.

Увеличение концентрации флюдарабина в культуре более 3,7 мкг/мл не приводит к дополнительной гибели клеток.

Таким образом, концентрации флюдарабина в культуре 0,41–3,7 мкг/мл являются оптимальными для оценки жизнеспособности клеток. Кроме того, выявлена обратная корреляционная зависимость между клинической эффективностью флюдарабина и количеством оставшихся живых опухолевых клеток.

Анализ соотношения жизнеспособности опухолевых клеток и концентраций флюдарабина в МТТ-тесте позволил выделить 2 подгруппы, в зависимости от LD₅₀ и ТПК флюдарабина (которая составила ~0,97 мкг/мл): чувствительные (LD₅₀ < ТПК, n=17) и нечувствительные (LD₅₀ > ТПК, n=16). Средняя кривая – это средние значения живых клеток всех исследованных больных при каждой концентрации флюдарабина. Нижняя кривая отражает средние значения процентов живых клеток при 5 концентрациях флюдарабина у чувствительных пациентов. Верхняя кривая показывает средние значения процентов живых клеток при 5 возрастающих концентрациях во второй подгруппе больных (рис. 5).

Сравнение результатов показало, что у чувствительных пациентов среднее значение живых клеток по 5 концентрациям флюдарабина *in vitro* достоверно меньше, чем у нечувствительных (табл. 2).

LD₅₀ в подгруппах чувствительных и нечувствительных больных так же достоверно (p < 0,05) различаются 0,47 ± 0,4 и 5,01 ± 5,7 мкг/мл, (рис. 6).

При анализе клинической эффективности флюдарабина в двух подгруппах также были получены отличающиеся результаты.

У чувствительных (n=17) зафиксировано 9 полных ремиссий, 5 частичных ремиссии (всего 82,4 % ответивших) и 3 стабилизации болезни. В подгруппе не чувствительных (n=16) клиническая эффективность была ниже: 2 полных ремиссии, 4 частичных ремиссий (всего 37,5 % ответивших), 7 стабилизации болезни и у 3 возникло прогрессирование болезни.

Полученные данные свидетельствуют о достоверно (p < 0,05) худших клинических результатах у не чувствительных пациентов согласно МТТ-тесту.

Заключение

При скрининге чувствительности опухолевых клеток к флюдарабину у резистентных больных ХЛЛ было установлено, что более половины (62,2 %) чувствительны к действию препарата *in vitro*. Клинический ответ свидетельствует о дозозависимом эффекте флюдарабина, что подтверждается данными фармакодинамики в МТТ-тесте, лучше клиническому эффекту соответствуют более низкие значения LD₅₀. При анализе клинических ответов после терапии флюдарabiном у больных с разной чувствительностью *in vitro* наблюдается четкая взаимосвязь: в группе больных, чувствительных к флюдарабину по МТТ-тесту, LD₅₀ достигалась при концентрации препарата 0,47–0,4 мкг/мл и наблюдалась большая клиническая эффективность (82,4 % ответивших) по сравнению с нечувствительными *in vitro*, LD₅₀ у которых составила 5,01–5,7 мкг/мл, p < 0,05 (37,5 % ответивших). Таким образом, полученные результаты указывают на то, что МТТ-тест может использоваться как достоверный метод в определении чувствительности опухолевых клеток к флюдарабину *in vitro*, и позволяет прогнозировать клиническую значимость препарата.

Таблица 2

Зависимость жизнеспособности опухолевых клеток от концентрации флюдарабина в МТТ-тесте

Группы	Концентрация флюдарабина <i>in vitro</i> , мкг/мл				
	0,41	1,23	3,7	11,1	33,3
	Количество живых клеток, %				
Чувствительные, n=17	47,5±3,8	31,6±2,5	24,8±1,6	21,1±1,5	16,7±1,6
Нечувствительные, n=16	63,4±2,4	52,8±1,7	47,5±1,6	41,4±2,3	35,2±2,8
Достоверность	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05

Литература

1. Bosanquet A.G., Jonson S.A., Richards S.M. Do not treat all CLL patients with fludarabine? // Brit. J. of Hematol. – 1998. – Vol. 102(1). – P. 190.
2. Bosanquet A.G., Stephen A.G., Richards S.M. High mortality of DiSC assay resistant CLL patients treated with fludarabine // Brit. J. of Hematol. – 1998. – Vol. 101. – P. 24.
3. Bowen A.L., Dearden C.E., Matutes E., Catovsky D. Fludarabine—combination chemotherapy in chronic lymphocytic leukaemia // Brit. J. of Hematol. – 1999. – Vol. 105(1). – P. 85.
4. Juliusson G. Complications in the treatment of CLL with purine analogues // Hematology and Cell Therapy. – 1997. – Vol. 39. – P. S41–S44.
5. Morabito F., Steliana C., Callea I. et al. In vitro drug-induced cytotoxicity predicts clinical response to fludarabine in B-cell chronic lymphocytic leukemia // Brit. J. Of Hematol. – 1998. – Vol. 102. – P. 528–9.
6. Silber R., Degar B., Costin D. et al. Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs // Blood. – 1998. – Vol. 84. – P. 3440–6.

УДК 616.31-002.153-006-091:575.133

*Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, А.Ф. Батцев, Е.К. Дворова, Е.Г. Матякин***АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО И ТКАНЕВОГО ТИПОВ И ИХ ИНГИБИТОР PAI-1****В ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА: ВЗАИМОСВЯЗЬ С ОСНОВНЫМИ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва**Контактная информация:**

Кушлинский Николай Евгеньевич, заведующий лабораторией клинической биохимии РОНЦ

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе 24; **тел.** +7(495)324-11-79**e-mail:** biochimia@mtu-net.ru

Статья поступила: 26.11.2009, принята к печати: 04.12.2009.

Резюме

Иммуноферментными методами показано, что при раке слизистой оболочки полости рта происходит усиление активации плазминогена по урокиназному типу (уровня uPA) с параллельным увеличением уровня ингибитора PAI-1 в опухолях по сравнению с окружающей слизистой.

Статистически значимых ассоциаций уровня исследованных белков в опухолях с такими прогностическими факторами как локализация, форма роста, гистологическое строение и степень дифференцировки первичной опухоли, ее размер и распространенность, степень поражения регионарных лимфатических узлов, стадия заболевания не выявлено.

Ключевые слова: активатор плазминогена урокиназного типа, активатор плазминогена тканевого типа, ингибитор активаторов плазминогена I типа, рак слизистой оболочки полости рта.

*N.E. Kushlinsky, E.S. Gershtein, A.F. Batsev, E.K. Dvorova, E.G. Matyakin***UROKINASE AND TISSUE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATORS AND THEIR INHIBITOR PAI-1 IN THE TUMORS OF PATIENTS WITH ORAL CAVITY CARCINOMAS: ASSOCIATION WITH MAJOR CLINICO-MORPHOLOGIC FACTORS**

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

Abstract

Immunoenzymatic investigation demonstrated elevation of urokinase type plasminogen activation (uPA level) accompanied by an increase of PAI-1 level in oral cavity carcinomas as compared to adjacent mucosa.

No statistically significant associations were revealed between the levels of the proteins studied and such prognostic factors as localization, growth form, histological structure and differentiation grade of primary tumor, its size and spread, lymph node involvement, disease stage.

Key words: urokinase type plasminogen activator, tissue type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor I, oral cavity carcinoma.

Введение

Плоскоклеточный рак органов полости рта и ротоглотки – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований головы и шеи и по частоте занимает второе место после рака гортани.

Несмотря на легкую доступность полости рта для визуального осмотра, более 2/3 больных обращаются за специализированной помощью с III или IV стадиями опухолевого процесса, поэтому лечение данной категории пациентов крайне сложно, а часто даже малоэффективно.

Многие исследователи связывают дальнейший прогресс не только с рациональным использованием комбинированных и комплексных методов лечения, но и с разработкой принципиально новых патогенетических методов терапии, основанных на современных достижениях в изучении биохимии и молекулярной биологии опухолей.

К числу фундаментальных свойств злокачественных опухолей, безусловно, относится способность к инвазии в окружающие ткани и метастазированию в отдаленные органы, а одним из основных механизмов этих процессов является разрушение базальной мем-

браны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами, участвующими также в не-оангиогенезе, способствуя распространению новых сосудов. В инвазии и метастазировании задействовано несколько классов протеаз, в первую очередь это протеолитический каскад активации плазминогена с образованием плазмина и активируемые им матриксные металлопротеиназы, разрушающие коллаген и другие компоненты опухолевой стромы.

В систему активации плазминогена входят два типа активаторов – урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типов, активность которых подавляется двумя белковыми ингибиторами – PAI-1 и PAI-2 [5]. uPA секретируется в виде ферментативно неактивного одноцепочечного предшественника, который после связывания со специфическими рецепторами (uPAR) на поверхности клетки превращается под действием плазмина и некоторых других протеолитических ферментов в активную двухцепочечную молекулу. Активный uPA, в свою очередь, катализирует превращение плазминогена в плазмин.

Таким образом, весь процесс образования плазмина представляет собой циклическую амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи.

Уровень и соотношение экспрессии различных компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани может служить показателем метастатической и инвазивной активности опухоли, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза при различных новообразованиях [2; 6]. В настоящее время определение uPA и PAI-1 используется в некоторых странах в качестве обязательного теста для выявления прогностически неблагоприятных подгрупп среди больных ранними стадиями рака молочной железы [7].

Кроме того, подавление активации плазминогена по урокиназному типу является одним из перспективных подходов к разработке новых схем антиметастатической терапии различных опухолей, в том числе – рака слизистой оболочки полости рта [10; 14-15].

В целом, роль системы активации плазминогена при опухолях слизистой оболочки полости рта изучена недостаточно, хотя в отдельных клинико-лабораторных исследованиях уже продемонстрирована неблагоприятная роль uPA и PAI-1, а также uPAR в прогнозировании результатов лечения различных форм этого заболевания [3; 8-9; 11-13].

В связи с этим, целью данного исследования явилось сравнительное изучение содержания uPA, tPA и PAI-1 в ткани рака и неизменной слизистой полости рта, а также оценка взаимосвязи содержания этих белков в опухолях с клинико-морфологическими особенностями заболевания.

Материалы и методы

В исследование были включены больные раком слизистой оболочки полости рта, лечившиеся в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2007-2009 гг.

Всего обследовано 40 человек (30 мужчин и 10 женщин) в возрасте от 32 до 84 лет (медиана – 54 года). У 12 больных диагностирован рак подвижной части, у 5 – корня языка; рак дна полости рта выявлен у 7 пациентов, рак альвеолярного отростка и ретромолярной области – у 6 и 5 больных, соответственно; другие локализации представлены единичными наблюдениями.

У 32 (82%) пациентов были распространенные (III и IV) стадии заболевания. По гистологическому строению большинство опухолей (32) представляли собой плоскоклеточный неороговевающий рак.

У всех больных параллельно исследованы опухоли и гистологически неизменные участки слизистой полости рта. Материал для исследования брали во время операции. Кусочки тканей (100-200 мг) из операционной доставляли на леду в лабораторию и хранили при -70°C до начала исследования.

Концентрации uPA, PAI-1 и tPA в цитозолях, полученных как описано ранее [1], определяли прямыми иммуноферментными методами с использованием стандартных наборов фирмы Technoclone GmbH (Австрия) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации анализируемых белков выражали в нг/мг цитозольного белка, который определяли методом Лоури.

При сравнении показателей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса и Вилкоксона, взаимосвязь показателей оценивали с помощью теста корреляции рангов Спирмена (R). Различия и корреляции считали достоверными при $p < 0,05$.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica для Windows (версия 7.0).

Результаты и их обсуждение

В 90% опухолей обнаружены измеримые количества uPA и PAI-1, при этом uPA выявлен только в 3 образцах гистологически неизменной слизистой полости рта (7%), а PAI-1 – в 20 (50%). Концентрации uPA и PAI-1 в опухолевой ткани были достоверно выше, чем в слизистой у 93 и 85% больных соответственно ($p < 0,0001$). Концентрации этих белков в цитозолях опухолей колебались в достаточно широких пределах (табл. 1).

Измеримые, но достаточно низкие уровни tPA обнаружены во всех исследованных образцах опухолевой и неизменной ткани (*ibid.*), при этом у 70% больных содержание этой протеазы в неизменной слизистой было выше, чем в опухоли, а медианные показатели достоверно не отличались.

Отмечена положительная корреляционная взаимосвязь между концентрациями tPA в опухолевой ткани и неизменной слизистой ($R = 0,40$, $p < 0,01$). Концентрация PAI-1 в опухолевой ткани не коррелировала с показателями нормальной слизистой полости рта, а uPA в неизменной слизистой практически отсутствовал. В то же время выявлена высокодостоверная положительная взаимосвязь между уровнями uPA и PAI-1 в опухолевой ткани ($R = 0,84$; $p < 0,001$). Эти закономерности свидетельствуют о том, что усиление экспрессии uPA и PAI-1 в опухолевой ткани не зависит от их исходного уровня в слизистой полости рта, в то время как экспрессия tPA в опухоли напрямую связана с базальным содержанием этого фермента в слизистой данного больного.

Таким образом, в ткани рака слизистой оболочки полости рта наблюдается существенное и коррелированное увеличение концентрации uPA и PAI-1 по сравнению с окружающей слизистой. Уровень tPA в злокачественных опухолях, как правило, заметно снижен по сравнению с нормой. Полученные результаты согласуются с данными литературы по опухолям полости рта [4; 8], также полученными иммуноферментными методами, а также с нашими данными для опухолей различного гистогенеза [2].

Для того чтобы оценить клиническое значение определения исследуемых маркеров в опухолях больных раком слизистой оболочки полости рта, мы проанализировали взаимосвязь этих показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания (табл. 2). Четких статистически значимых ассоциаций уровня исследованных белков в опухолях с такими прогностическими факторами, как локализация, тип роста, гистологическое строение и степень дифференцировки первичной опухоли, ее размер и распространенность (T), степень поражения регионарных лимфатических узлов (N) не выявлено. Можно отметить лишь ряд тенденций, которые могут приобрести не только статистическую, но и биологическую значимость при увеличении обследуемых групп больных. Так, уровни uPA и PAI-1 оказались наиболее высокими при II стадии процесса, причем для uPA отличие от такового III стадии было статистически значимым ($p < 0,05$). Эти данные согласуются с результатами, полученными нами при некоторых других новообразованиях (рак молочной железы, рак легкого, рак яичников) и свидетельствовали о том, что наибольшей инвазивностью и метастатическим потенциалом, если судить по уровню изученных компонентов системы активации плазминогена, опухоли обладают на ранних этапах инвазии и метастазирования [1].

Таблица 1

Содержание (нг/мг белка) компонентов системы активации плазминогена в цитозолях опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей больных раком слизистой оболочки полости рта.

Показатель	Опухоль (Т)		Слизистая (N)		Т>N %
	Диапазон	Медиана, 25-75%	Диапазон	Медиана, 25-75%	
uPA	0 – 14,6	1,6* 0,88 – 2,6	0 – 1,4	0 0 - 0	93
PAI-1	0 – 113,8	18,6* 4,2 – 50,8	0 – 34,7	0,05 0 – 1,2	85
tPA	0,14 – 5,0	0,30 0,23 – 0,41	0,13 – 1, 8	0,35 0,28 – 0,45	30

* p<0,0001 по сравнению с неизменной слизистой (парный критерий Вилкоксона)

Таблица 2

Содержание компонентов системы активации плазминогена в цитозолях опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей больных раком слизистой оболочки полости рта в зависимости от основных клинико-морфологических характеристик.

Критерий	Градация	n*	Концентрация (нг/мг белка) медиана, разброс		
			uPA	PAI-1	tPA
Стадия	I	2	1,4 0-2,9	30,0 0-59,9	0,18 0,14-0,22
	II	5	3,2** 0,8-14,6	36,0 0-63,4	0,34 0,23-0,43
	III	10	1,0** 0-7,2	7,6 0-79,1	0,26 0,19-1,25
	IV	22	1,7 0-11,5	18,0 0-113,8	0,32 0,14-0,91
T	T ₁	2	1,4 0-2,9	30,0 0-59,9	0,18 0,14-0,22
	T ₂	9	2,6 0-14,6	10,6 0-63,4	0,33 0,23-0,43
	T ₃	13	1,6 0-7,2	23,4 0-98,3	0,26 0,14-1,25
	T ₄	15	1,7 0,3-11,5	18,6 0-113,8	0,31 0,16-0,91
N	N ₀	17	1,6 0-14,6	23,5 0-79,1	0,30 0,14-1,25
	N ₁	9	1,5 0-2,6	10,6 0-108,4	0,26 0,16-0,64
	N ₂	14	1,8 0-11,5	24,8 0-113,8	0,32 0,14-0,91
Форма роста	Экзофитная	4	4,2 0,3-8,4	35,0 27,4-79,1	0,21 0,16-0,43
	Эндофитная	7	1,8 0-3,6	14,0 0-98,3	0,25 0,14-0,62
	Смешанная	28	1,5 0-14,6	14,0 0-113,8	0,32 0,14-1,25
Морфология (плоскоклеточный рак)	Ороговевающий	32	1,5 0-14,6	18,50 0-108,4	0,28 0,14-1,25
	Неороговевающий	7	1,8 0-11,5	23,4 0-113,8	0,33 0,22-0,91
Дифференцировка	Высокая	30	1,6 0-11,5	18,0 0-113,8	0,30 0,14-1,25
	Умеренная	9	1,6 0,3-14,6	23,4 0,3-63,4	0,29 0,2-0,46
Продолженный рост опухоли	да	13	1,4 0-11,5	18,6 0-113,8	0,31 0,14-1,25
	нет	14	1,7 0-14,6	9,0 0-79,1	0,25 0,16-0,84

* число больных

** p(II-III)<0,05 (тест Манна-Уитни)

Кроме того, медианные уровни uPA и PAI-1 при экзофитной форме роста рака слизистой оболочки полости рта оказались более чем вдвое выше, чем при эндофитной и смешанной, а уровень PAI-1 был также двукратно увеличен при наличии продолженного роста опухоли (во всех случаях $p > 0,05$).

Таким образом, на примере рака слизистой оболочки полости рта нам удалось подтвердить выявленную ранее [1–2] закономерность, заключающуюся в том, что в большинстве злокачественных опухолей различного гистогенеза происходит значительное и координированное увеличение экспрессии uPA и PAI-1 по сравнению с таковыми в гомологичных нормальных тканях.

Это наблюдение может иметь как теоретическое, так и практическое значение.

С одной стороны, оно свидетельствует о том, что усиление активации плазминогена по уроки-

назному типу, сопровождающееся усилением защиты опухолевых клеток от саморазрушения (за счет увеличения уровня PAI-1), является достаточно универсальным признаком малигнизации.

С другой стороны, повышенная экспрессия uPA в опухоли по сравнению с окружающей тканью делает этот фермент перспективной избирательной мишенью для антиметастатической терапии при раке слизистой оболочки полости рта, характеризующемся достаточно низкой чувствительностью к стандартным видам химиотерапии.

Отсутствие четкой взаимосвязи тканевых концентраций uPA и PAI-1 с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания не исключает их потенциальной роли маркеров в качестве независимого фактора прогноза безрецидивной и общей выживаемости. Это может быть доказано при более длительном наблюдении за больными и увеличении обследованной группы.

Литература

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Активаторы плазминогена урокиназного и тканевого типов и их ингибитор PAI-1 в опухолях человека. // 2001.-Vol. 131 (1). – P. 81–7.
2. Герштейн Е.С., Талаева Ш.Ж., Сандыбаев М.Н., Кушлинский Н.Е. Клиническая роль системы активации плазминогена в опухолях человека. // Молекулярная медицина. – 2007. – Vol. (1). – P. 4-8.
3. Vacchiocchi R., Rubini C., Pierpaoli E. et al. Prognostic value analysis of urokinase-type plasminogen activator receptor in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study // BMC Cancer. – 2008. – Vol. 8. – P. 220.
4. Baker E.A., Leaper D.J., Hayter J.P., Dickenson A.J. Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma // Br. J. Oral Maxillofac Surg. – 2007. – Vol. 45 (8). – P. 623-7.
5. Duffy M.J. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy // Curr. Pharm. Des. – 2004. – Vol. 10 (1). – P. 39-49.
6. Duffy M.J., Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer // Clin. Biochem. – 2004. – Vol. 37 (7). – P. 541-8.
7. Harbeck N. Use of uPA and PAI-1 to personalise therapy in patients with breast cancer // International Society of Oncology and Biomarkers, 37th Meeting Biomarkers and New Treatment Strategies in Oncology ISOBM 2009 – Amsterdam, The Netherlands, September 27-30, 2009 – P. 114.
8. Hundsdorfer B., Zeilhofer H.F., Bock K.P. et al. Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value // J. Craniomaxillofac. Surg. – 2005. – Vol. 33 (3). – P. 191–6.
9. Nozaki S., Endo Y., Kawashiri S. et al. Immunohistochemical localization of a urokinase-type plasminogen activator system in squamous cell carcinoma of the oral cavity: association with mode of invasion and lymph node metastasis // Oral Oncol. – 1998. – Vol. 34 (1). – P. 58-62.
10. Nozaki S., Endo Y., Nakahara H. et al. Inhibition of invasion and metastasis in oral cancer by targeting urokinase-type plasminogen activator receptor // Oral Oncol. – 2005. – Vol. 41 (10). – P. 971-7.
11. Shi Z., Stack M.S. Urinary-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in squamous cell carcinoma of the oral cavity // Biochem J. – 2007. – Vol. 407 (2). – P. 153–9.
12. Speleman L., Kerrebijn J.D., Look M.P. et al. Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma // Head Neck. – 2007. – Vol. 29 (4). – P. 341–50.
13. Strojjan P., Budihna M., Smid L. et al. Urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 and cathepsin D: analysis of their prognostic significance in squamous cell carcinoma of the head and neck // Anticancer Res. – 2000. – Vol. 20 (5C). – P. 3975-81.
14. Yang S.F., Yang W.E., Kuo W.H. et al. Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases // Arch. Oral Biol. – 2008. – Vol. 53 (3). – P. 287–94.
15. Zhou H., Tang Y., Liang X. et al. RNAi targeting urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits metastasis and progression of oral squamous cell carcinoma in vivo // Int. J. Cancer. – 2009. – Vol. 125 (2). – P. 453–62.

УДК 618.15-006.448-073.43

*М.А. Чекалова, О.В. Камаева, Е.Е. Махова, А.А. Кузумова***СЛУЧАЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛИ ВЛАГАЛИЩА**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Чекалова Марина Альбертовна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник отделения амбулаторных методов диагностики и лечения НИИ клинической онкологии

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(903)-199-50-96**e-mail:** ch2me@yandex.ru

Статья поступила 16.10.2009, принята к печати 12.10.2009.

Резюме

Рассмотрен случай специфического поражения влагалища при неходжкинских лимфомах. Применение ультразвуковой томографии дает возможность уточнить диагноз экстранодальной лимфомы и осуществлять мониторинг эффективности лечения.

Ключевые слова: ультразвуковая диагностика, неходжкинские лимфомы, влагалище, эхография.*M.A. Chekalova, O.V. Kamaeva, E.E. Makhova, A.A. Kuzumova***THE ULTRASOUND DIAGNOSIS OF VAGINA TUMORS**

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

Abstract

We have studied the specific damage of vagina in patients with non-Hodgkin lymphoma. Our data indicate that the ultrasound tomography could correct diagnosis of the extranodular lymphoma and predict the efficacy of treatment.

Key words: ultrasound diagnosis, non-Hodgkin lymphoma, vagina, echography.**Введение**

Опухоли вульвы и влагалища имеют немалый удельный вес в числе онкопатологии женских гениталий. Это новообразования, встречающиеся в различные периоды жизни женщины. Так, среди злокачественных опухолей половых органов детского возраста – частота опухолей влагалища 10–15 %, в репродуктивном периоде женщины частота опухолей вульвы и влагалища снижается до 7 %, а во время поздней менопаузы опять возрастает до суммарных 15 % [3]. В России ежегодно диагностируется около 4 000 новых случаев рака вульвы и влагалища, при этом регистрируемая ежегодная смертность от данной патологии – около 1 000 женщин [5]. Преобладающий морфологический вариант (90 %) – плоскоклеточный рак. Прогноз при злокачественных опухолях вульвы и влагалища зависит от морфологического варианта опухоли, стадии заболевания, поражения лимфатических узлов и наличия отдаленных метастазов [2; 14]. В последнее время достигнуты определенные положительные результаты при лечении этой патологии, которые в полной мере зависят от эффективности ранней диагностики.

Однако следует отметить, что возможности различных методов визуализации при диагностике новообразований вульвы и влагалища изучены в настоящее время недостаточно; в связи с чем, на наш взгляд, может быть интересен любой опыт ультразвуковой диагностики указанных заболеваний.

Клиническое наблюдение редкой опухоли влагалища.

Больная К., 1980 г. р., находилась на стационарном лечении в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина с диагнозом «диффузная В-крупноклеточная лимфома с поражением влагалища, распространением на шейку матки; II АЕ стадия». Поступила с жалобами на ацикли-

ческие кровянистые выделения из половых путей. Из *an. morbi*: считает себя больной с марта 2008 г., когда отметила появление ациклических кровянистых выделений из половых путей. При осмотре по месту жительства заподозрена онкологическая патология матки. Обследована в областном онкологическом диспансере, где выявили опухолевый конгломерат в области малого таза неясной этиологии. Произведена биопсия влагалища.

Цитологическое заключение: в полученном материале найденные изменения соответствуют код 8000/3 – новообразование злокачественное. Лимфома? Направлена в поликлинику РОНЦ, где пациентке было проведено комплексное обследование, в результате которого установлен настоящий диагноз (после чего госпитализирована для проведения специфической терапии). Состояние пациентки удовлетворительное. Кожные покровы чистые. В легких дыхание везикулярное, хрипов нет. Тоны ритмичные приглушены. АД 110/70 мм.рт.ст. Живот мягкий, безболезненный во всех отделах. Печень у края легочной дуги. Селезенка не увеличена. Периферических отеков нет. Мочеиспускание свободное. На первом этапе обследования проведено ультразвуковое исследование брюшной полости, забрюшинного пространства, внутренних гениталий и периферических лимфатических узлов.

Трансабдоминальная эхография: выявлен бугристый конгломерат неправильной формы, с четкими контурами, расположенный в области малого таза кзади от мочевого пузыря (рис. 1). Первоначально было сложно детализировать отдельно матку и придатки. Однако при тщательном изучении ультразвуковой картины, использовании трансвагинального доступа удалось установить, что стенки влагалища циркулярно, практически на всем протяжении – до 8,5 см неравномерно (до 3,5–4,5 см) утолщены (рис. 2). Анатомическое строение и контуры стенки влагалища сохранены, но структура изменена в сторону снижения эхогенности, большей частью в области слизистого и подслизистого слоев, отмечено увеличение звукопроводимости, отсутствие дополнительных включений и узлов.

Применение ЦДК и ЭД позволило визуализировать патологическую васкуляризацию на всем протяжении указанных изменений (рис. 3). Аналогичные изменения выявлены на ограниченном участке в передней губе шейки матки. Другой патологии при УЗТ внутренних гениталий не обнаружено. Периферические, забрюшинные и внутрибрюшинные лимфатические узлы, печень, селезенка не увеличены, изменений в структуре их не выявлено. Высказано предположение о специфическом поражении влагалища при лимфопролиферативном заболевании.

Пациентка обследована онкогинекологом: передняя стенка влагалища представляет на всем протяжении «бульжную мостовую» за счет экзофитно-эндофитной опухоли. Аналогичное поражение определяется в верхней трети задней и левой боковой стенок влагалища. Мазки, биопсия. Выделения сукровичные. Шейка матки умеренно гиперемирована, слизистая ее не изменена. При пальпации шейка плотная, «бочкообразная». Мазки, биопсия. Тело матки нормальной величины, область придатков без особенностей.

Гистологическое заключение ИГХ (влагалище) с целью верификации диагноза на материале №24652/08 проводилось иммуногистохимическое исследование с использованием антител CD20, CD3, CD23, CD10, Ki-67, рап СК (AE1/AE3), bcl-2, bcl-6. Опухолевые клетки экспрессируют CD20, bcl-6.

При реакции с Ki-67 позитивно около 90 % опухолевых клеток. Опухолевые клетки не экспрессируют CD23, CD10, рапСК(AE1/AE3), bcl-2. При реакции с CD3 позитивны отдельные, дискретно расположенные Т-лимфоциты. Заключение: Морфоиммуногистохимическая картина соответствует диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме с высокой пролиферативной активностью, не фолликулярного происхождения (рис. 4).

Гистологическое заключение (трепанобиопсия подвздошной кости) отломки костной ткани с нормоклеточным костным мозгом. В клеточном составе элементы всех ростков кроветворения.

Миелограмма: пунктат клеточный. Мегакариоциты в достаточном количестве. Состав миелограммы в пределах нормы.

Результаты обследования: общий анализ крови: эритро. $4,36 \times 10^{12}/л$; гем. 12,5 г/дл; лейкоциты $5,04 \times 10^9/л$ (п/я – 2 %, с/я – 66 %, лимф. – 28 %, моно – 2 %, эоз. – 2 %); тр. $317 \times 10^9/л$, СОЭ 80 мм/ч. Биохимический анализ крови: глюкоза – 5,1 ммоль/л; альбумин – 42,1 г/л; креатинин – 93 мкмоль/л; общий белок – 73 г/л; АСТ – 19,4 ед/л; ЛДГ – 329 ед/л. Коагулограмма: АПТВ 28 сек; фибриноген 284 мг/дл; протромбин 95 %; МНО 1,04 ед; протромбиновое время 13,2 сек; РКМФ этанол тест отрицательный; Д-димер 0,12.

ЭГДС: недостаточность розетки кардии. Диффузный поверхностный гастрит. Дуоденит.

ЭКГ: ритм синусовый. ЧСС 73 в мин. Нормальное положение ЭОС.

Рентгенография органов грудной клетки: в легких без очаговых и инфильтративных изменений. Корни и средостение не расширены. Синусы свободны.

В соответствии с установленными стандартами лечения НХЛ пациентке проведено 6 курсов ПХТ по схеме R-СНОР (мабтера 700 мг в день 1; доксорубин 75 мг в день 2; циклофосфан 1200 мг в день 2; винкристин 2 мг в день 2; медрол 64 мг дни 2–6. Без осложнений. С целью защиты функции яичников на время проведения химиотерапии рекомендован золадекс 3,6 мг в клетчатку передней брюшной стенки. Симптоматическая терапия: омес 1к (20 мг) внутрь 1 р/д, аллопуринол 600 мг внутрь 1–6 день внутрь, клексан 0,4 мг п/к. В результате проведенной терапии достигнут положительный эффект в виде уменьшения и исчезновения опухоли (рис. 5 А–Б), что подтверждено клинико-инструментальным и морфологическим обследованием.

Заключение

В доступных литературных источниках [2; 10; 14; 19] сведения о возможности ультразвуковой томографии при лимфоме достаточно ограничены. За последние 25 лет в литературе описано около 60 наблюдений патологии шейки матки, около 200 – в теле матки, встречаются единичные описания изменений влагалища и вульвы. Среди них преобладают В-клеточные формы. В исследовании, проведенном J. Freeman среди 1467 пациенток с экстранодальными проявлениями НХЛ, было выявлено 18 пациенток с поражением молочной железы, лишь три случая – шейки матки и один – влагалища [8; 9; 13].

Неходжкинские лимфомы представляют собой полиморфную группу злокачественных лимфопролиферативных опухолей, различных по морфологическому строению, клиническим проявлениям и прогнозу. В России НХЛ составляют 2,6 % от всех злокачественных опухолей. Смертность от злокачественных лимфом равна 2,3 % от общей онкологической смертности [6; 7]. В практической медицине окончательный диагноз и определение варианта лимфомы устанавливается по биопсийному материалу после гистологического исследования с иммунофенотипированием субстрата [4; 12; 16].

Первичный очаг лимфомы может локализоваться в лимфатических узлах (нодулярное поражение) или в других органах и тканях (экстранодальное поражение). Изменения в отдельных органах могут иметь как диффузный, так и локальный характер. НХЛ, как правило, начинается с появления одиночного опухолевого узла и распространяется путем лимфогенного и/или гематогенного метастазирования. Часто диагноз НХЛ с экстранодальной локализацией устанавливается уже после операции, т.к. подобные очаги манифестируют клинику рака или доброкачественных опухолей пораженных органов [17; 18].

Наиболее распространенной экстранодальной локализацией НХЛ являются органы желудочно-кишечного тракта, которые составляют 10–24 % всех неходжкинских лимфом и 30–45 % от ее экстранодальных форм. В целом, экстранодальные лимфомы, по данным разных исследователей [6; 7; 17], составляют от 24 до 48 % всех НХЛ. Актуальность совершенствования первичных методов диагностики экстранодальных форм неходжкинских лимфом вызвана ежегодным 10 % приростом заболеваемости в развитых странах [6; 7]. Редкость патологии приводит к чисто описательному анализу всех случаев в литературе без выработки четких рекомендаций и определенного диагностического алгоритма-стандарта. Принимая во внимание, что заболевание может развиваться достаточно агрессивно, и клинические проявления его очень разнообразны, перед клиницистом стоит задача быстрого и оптимального выбора диагностических методик для первичного этапа обследования. По мнению ряда авторов, приоритетным методом первичной диагностики НХЛ, включающим определение локализации и распространенности заболевания, является компьютерная томография (КТ) [1; 11; 20].

Однако более доступным является УЗТ, информативность которой при оснащении современными технологиями очень высока. Вместе с тем немаловажен тот факт, что эхография – более экономически выгодный диагностический метод [1; 10, 15]. В связи с чем, на наш взгляд, использование УЗТ при диагностике экстранодальной НХЛ вполне оправдано.

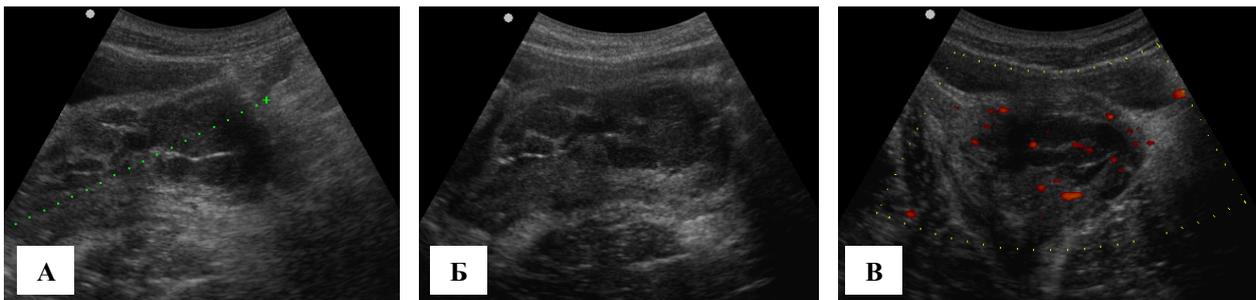


Рис. 1. А–В. Эхограммы больной К. Специфическое поражение влагалища при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Трансабдоминальное исследование в продольной и поперечной плоскости.

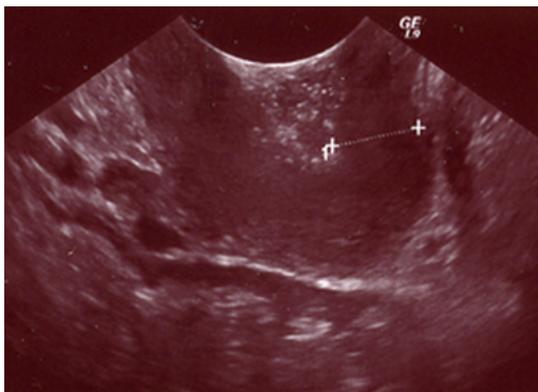


Рис. 2. Эхограмма больной К. Специфическое поражение влагалища при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Трансвагинальное исследование.



Рис. 3. Доплерография. Специфическое поражение влагалища при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.

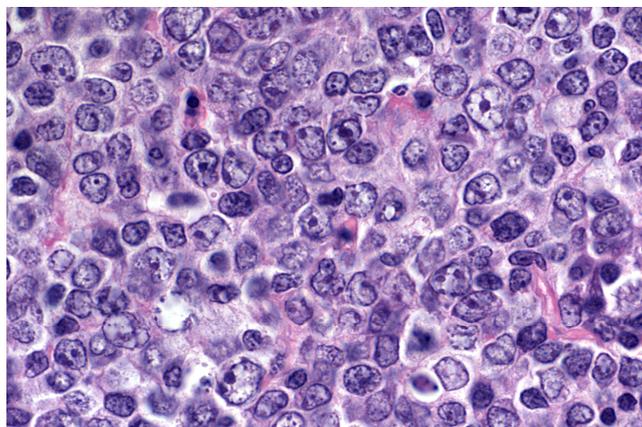


Рис. 4. Диффузная В-клеточная лимфома (микропрепарат).

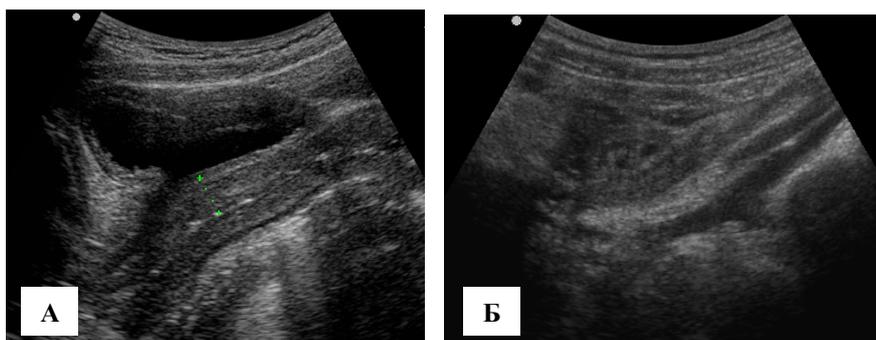


Рис. 5 А–Б. Эхограмма больной К. Специфическое поражение влагалища при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Состояние после 2 курсов полихимиотерапии.

Литература

1. Голенков А.К., Калужский А.А., Харченко Н.В. Сравнительная оценка эффективности ультразвукового исследования и компьютерной томографии в диагностике неходжкинских лимфом абдоминальной и ретроперитонеальной локализации // Мед. радиол. – 1992. – №3–4. – С. 40–2.
2. Демидов В.Н., Зыкин Б.И. Ультразвуковая диагностика в гинекологии. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
3. Клиническая онкогинекология: Руководство для врачей. Под ред. В.П. Козаченко. – М.: ОАО «Издательство «Медицина»», 2005. – С. 93–100.
4. Кондратьева Т.Т. Цитологическая диагностика злокачественных лимфом // Современная онкология. – 2006. – №1. – С. 4–8.
5. Опухоли женской репродуктивной системы. Под ред. М.И. Давыдова, В.П. Летагина, В.В. Кузнецова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2007. – С. 190–6.
6. Поддубная И.В. Клиническая гематология. Под ред. М.А.Волковой. – М.: «Медицина», 2001. – С.336–75.
7. Поддубная И.В., Балакирева Ю.Н. Клинико-морфологические особенности и факторы прогноза при первичных экстраодальных неходжкинских лимфомах // VIII Российский онкологический конгресс. Москва, 22–24 ноября 2004 г. – С. 165–7.
8. Crawshaw J., Sohaib S.A. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the ovaries: imaging findings // British Journal of Radiology. – 2007. – Vol. 80. – P. 155–8.
9. Freeman C., Berg J.W., Cutler S.J. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas // Cancer. – 1972. – Vol. 29. – P. 252–60.
10. Jahasz B., Kurjak A., Lampe L. et al. Tissue characterisation by transvaginal Color Doppler for the evaluation of gynaecological tumours // Acta Med Hung. – 1990. – Vol. 47(3–4). – P. 149–56.
11. Hawkins R.A., Hoh C., Glaspy J. et al. The role of position emission tomography in oncology and other whole body applications // Sem Nucl Med. – 1992. – Vol. 22. – P. 268–84.
12. Katz R., Gritsman A. Fine needle aspiration cytology of peripheral T-cell lymphoma // Am J Clin Patbol. – 1989. – Vol. 91. – P. 120–31.
13. Kosari F., Daneshbod Y., Parwaresch R. et al. Lymphomas of the genital tract: a study of 186 cases and review of literature // Am. J. Surg. Pathol. – 2006. – 30(9). – P. 1202–3.
14. Kurjak A., Jurkovic D., Alfirevic Z. et al. Transvaginal Color Doppler Imaging // J Clin Ultrasound. – 1990. – Vol. 18. – P. 227–34.
15. Lago A.S., Robboy S.J. Lymphoma of the Female genital tract – current status // Int. J. Gynaecol. Pathol. – 2006 – Vol. 25. – P. 1–21.
16. Martin H.E., Ellis E.B. Biopsy by puncture and aspiration // Ann Surg. – 1999. – Vol. 92. – P. 169–81.
17. Molina A., Pezner R.D. Non-Hodgkin's lymphoma. In: Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD, eds. Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 5th ed. Melville, NY: PRR, Inc; 2000. – P. 583–618.
18. Morris-Stiff G., Cheang P., Key S. et al. Does the surgeon still have a role to play in the diagnosis and management of lymphomas? // World J Surg Oncol. – 2008. Vol. 6. – P. 13.
19. Nakajima Y., Hirai T., Saito M. Contrast – enhanced ultrasonographic imaging of non-Hodgkins lymphoma // Ultrasound in Medicine and Biology. – 2005. – Vol. 32. – P. 283–4.
20. Nihal Uslu Tutara, Esra Ozgula. An unusual cause of obstructive jaundice; computed tomography and ultrasound findings of duodenal non-Hodgkin's lymphoma // European J. Radiology. – 2007. – Vol. 63(2). – P. 69–73.

Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

Разработка высокоэффективного рефолдинга рекомбинантного ИФН- α -2 β человека

Лаборатория трансгенных препаратов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Актуальность. В настоящее время с применением биотехнологий производят различные лекарственные белки, в т.ч. гормоны, ферменты, антитела и цитокины. Среди последних важное место занимают интерфероны (ИФН), широко используемые в медицинской практике, в частности в терапии онкологических заболеваний.

Для получения рекомбинантных белков используют различные экспрессионные системы. Наиболее популярной является культура клеток *E. coli*. За счет накопления большого объема белка в бактериальной клетке происходит его агрегации в виде нерастворимых телец включения.

В такой форме белок биологически не активен. Для восстановления активности необходимо проведение процедуры рефолдинга. Наши исследования посвящены разработке процессов высокоэффективного рефолдинга рекомбинантного ИФН- α -2 β человека в растворе и на аффинной колонке.

Материалы и методы. Для проведения рефолдинга в растворе ИФН- α -2 β человека инкубировали в буфере, содержащем L-аргинин при температуре +4 °С в течение ночи. При разработке метода рефолдинга на аффинной колонке использовали технологию градиентной смены буферов.

Результаты. Ранее нами были сконструированы три генетические конструкции ИФН- α -2 β человека и выбрана наиболее удачная в отношении эффективности экспрессии в бактериальной культуре и качества очистки при помощи аффинной хроматографии. В настоящем исследовании разработаны оптимальные условия для проведения рефолдинга ИФН- α -2 β человека. Оригинальной модификацией метода являлось включение в состав растворов для рефолдинга различных аминокислот. Наилучшие результаты были получены с глицином и аргинином.

Эффективность процесса составила более 70 %. В сравнении с литературными данными наши результаты соответствуют максимальным показателям, полученным при рефолдинге других аналогичных рекомбинантных белков по более сложным методикам. В настоящее время отработывается методика проведения рефолдинга на колонке для аффинной хроматографии. При использовании плавной градиентной смены буферов было получено более 30 % растворимого ИФН. Ожидаемая эффективность данного подхода составляет до 60–70 % целевого белка.

Вывод. Разработанная нами методика высокоэффективна для проведения рефолдинга ИФН- α -2 β человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ

УДК 616-002.4:615.277.3:616-006.81-091.8

*Е.Г. Славина, Х.А. Бигвава, Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, Л.Ф. Морозова, А.И. Черткова,
В.А. Нуртдинова, З.Г. Кадагидзе*

МОДИФИКАЦИЯ ФАКТОРОМ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ (ФНО- α) ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И АПОПТОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВ В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Славина Елена Григорьевна, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ клинической онкологии

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)324-94-14, моб. +7(903)590-10-52

e-mail: elena.slavina@gmail.com

Статья поступила 29.09.2009, принята к печати 20.10.2009.

Резюме

В настоящем исследовании было проведено изучение взаимодействия отечественного рекомбинантного препарата фактора некроза опухоли альфа – Альнорина с противоопухолевыми лекарствами дакарбазином (DTIC), BCNU и ACNU, применяемыми в клинике для лечения злокачественной меланомы, в индукции цитотоксического действия и апоптоза в клетках 6 линий меланом, полученных из опухолей больных.

Показано, что клетки отдельных линий проявляют различную чувствительность к этим лекарствам, и Альнорин усиливает цитотоксичность лекарств. Преимущественно – на резистентных клетках в концентрациях, в которых сам Альнорин не токсичен для клеток. Он также усиливает интенсивность апоптоза, индуцированного DTIC, в резистентных клетках. В этой системе интерфероны- α и - γ не проявили подобной активности.

Ключевые слова: меланома, противоопухолевые лекарства, фактор некроза опухоли, цитотоксичность, апоптоз.

*E.G. Slavina, H.A. Biguava, T.N. Zabolina, F.F. Borunova, L.F. Morozova, A.I. Chertkova,
V.A. Nurtidinova, Z.G. Kadagidze*

THE INTERACTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- α) WITH ANTITUMOR DRUGS AT THE INDUCTION OF CYTOTOXICITY AND APOPTOSIS IN THE HUMAN MELANOMA CELLS

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

Abstract

The interaction of Russian domestic recombinant tumor necrosis factor alfa – Alnorin – with antitumor drugs dacarbazine (DTIC), BCNU and ACNU, using at the clinic for the malignant melanoma treatment, as inducers of apoptosis has been studied in 6 melanoma cell lines derived from patients tumors.

It was demonstrated that the cells originated from different patients show the distinct sensitivity to these drugs and non-toxic Alnorin concentrations enhance drug cytotoxic effect mainly in the resistant cells. This drugs also enhances the intensity of apoptosis, induced by DTIC in resistant cells. Interferons - α and - γ did not show similar activity at the same system.

Key words: melanoma, antitumor drugs, tumor necrosis factor, cytotoxicity, apoptosis.

Введение

Фактор некроза опухолей (ФНО- α) был обнаружен в конце 1970-х гг. как цитокин, продуцируемый клетками иммунной системы и способный подавлять пролиферацию опухолевых клеток и индуцировать регрессию опухолей [4; 8]. В 1984 г. был клонирован ген ФНО, что послужило началом интенсивного изучения этого цитокина, а также привело к созданию его рекомбинантных препаратов. ФНО оказался многофункциональным белком, участвующим как в нормальных физиологических процессах, таких как рост и развитие органов и тканей, так и в патологических, таких как воспаление, опухолевый рост, отторжение трансплантатов, при ревматоидном артрите и при сеп-

тическом шоке [2]. В контроле роста опухолей ФНО может выполнять диаметрально противоположные функции – с одной стороны, индуцировать гибель опухолевых клеток, а с другой – стимулировать пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, повышать их выживаемость и усиливать ангиогенез в опухолях [9]. И эта двоякая направленность должна учитываться при попытках клинического применения ФНО.

Хотя ФНО может оказывать цитотоксическое, цитостатическое и иммуномодулирующее действие, его применение в качестве самостоятельного противоопухолевого лекарства очень ограничено из-за, во-первых, множества побочных эффектов и, во-вторых, по причине резистентности многих опухолевых клеток к его цитотоксическому действию.

На многих экспериментальных моделях, включая ксенотрансплантаты опухолей человека на бестимусных мышцах, было показано, что в переносимых дозах сам по себе ФНО очень слабо подавляет или вовсе не подавляет рост опухолей. Однако он проявляет синергизм с интерфероном- γ [3] и с некоторыми противоопухолевыми лекарствами [5] в индукции противоопухолевого ответа. Ранее мы описывали усиление цитотоксического действия противоопухолевых лекарств в отношении опухолевых клеток *in vitro* интерфероном- α [1].

В настоящей работе мы изучали взаимодействие *in vitro* отечественного рекомбинантного препарата ФНО- α – Альнорина – с противоопухолевыми лекарствами, применяемыми для лечения диссеминированной меланомы кожи, в отношении нескольких культуральных линий клеток меланомы человека в индукции цитотоксического действия и апоптоза.

Материалы и методы

Клеточные линии

Культуры клеток меланом были получены из хирургически удаленных меланомных узлов ферментативной обработкой после механической дезинтеграции. Клетки растили в пластиковых культуральных флаконах 25 см² (Costar, США) в питательной среде RPMI-1640 (предприятие ПанЭко, Москва) с добавлением 10 %-ной эмбриональной телячьей сыворотки (Perbio HyClone, США), 280 мкг/мл L-глутамина (ПанЭко), 80 мкг/мл гентамицина, незаменимых аминокислот и витаминов в термостате при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂.

Определение цитотоксического действия противоопухолевых лекарств и цитокинов

В работе использовали противоопухолевые препараты Дакарбазин (DTIC, Lachema, Чешская республика), Нидран (ACNU, Япония), BCNU (Bristol Myers Squibb, США). В качестве ФНО- α применяли отечественный рекомбинантный препарат Альнорин (ГНЦ «Вектор»), интерферона- α и - γ – также отечественные рекомбинантные препараты Реаферон (ГНЦ «Вектор») и Ингарон (ООО Фармаклон).

Цитотоксичность лекарств

В присутствии цитокинов или без них определяли высокочувствительным микроколориметрическим полуавтоматическим МТТ-тестом [6]. Клетки засевали в лунки 96-луночных планшетов (Costar) по 200 мкл/лунку при концентрации 2×10^4 в 1 мл, выращивали 1 сутки в термостате в атмосфере с 5% CO₂, заменяли ростовую среду такой же средой, содержащей различные концентрации лекарств, одного из цитокинов или смеси лекарства с цитокином или чистой средой (контроль) и инкубировали 24 или 48 ч при тех же условиях.

По окончании инкубации во все лунки вносили по 10 мкл раствора МТТ при исходной концентрации 5 мг/мл. После 4 ч инкубации при 37 °С образовавшиеся кристаллы формазана растворяли ДМСО и учитывали результаты на спектрофотометре Labsystems Multiscan MS определяя оптическую плотность (ОП) раствора при λ 540 нм. Интенсивность цитотоксичности высчитывали по формуле:

$$\%ЦТ = 100 - \left(\frac{ОП_{опыт}}{ОП_{контроль}} \times 100 \right)$$

Индукцию апоптоза

В целом (общего апоптоза) определяли окрашиванием клеток пропидиумом иодида. Для опреде-

ления интенсивности апоптоза клетки выращивали в лунках 6-луночных планшетов Costar, засевая их по 2 мл клеточной суспензии, содержащей 5×10^4 клеток/мл. После 1 суток культивирования в них так же, как и в опытах по цитотоксичности, вносили растворы лекарств с Альнорином или без него, инкубировали 24–48 ч при 37 °С, снимали с поверхности пластика обработкой раствором Версена, фиксировали ледяным 70 °С этанолом и окрашивали пропидиумом иодидом по методу Nicoletti [7].

Для выявления отдельно раннего и позднего апоптоза и клеток с признаками некроза проводили одновременное окрашивание живых нефиксированных клеток Annexin V и пропидиумом иодида по инструкции коммерческого набора. Пропорцию апоптотических клеток определяли на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, США) в программе LYSIS II, применяя однопараметровый гистограммный анализ по FL2 для пропидиума иодида и Dot Plot анализ F11 против FL2 для Аннексина с пропидиумом иодида. В каждом образце накапливали и анализировали 10^4 клеток.

Статистическую обработку результатов проводили по определению 50% цитотоксической (ЦД₅₀) и 50% и 10% апоптоз-индуцирующей (АД₅₀ и АД₁₀) дозы препаратов и критерию t Стьюдента с использованием компьютерной программы Sigma Plot for Windows (Jandel Scientific, USA) и пакета программ Statistica 5.0.

Результаты и обсуждение

Цитотоксичность лекарств в отношении клеток меланомы: эффект цитокинов

Как видно из табл. 1, разные линии меланом оказались в различной степени чувствительными к цитотоксическому действию лекарств. Так меланома Mel-II оказалась наиболее резистентной к цитотоксическому действию дакарбазина (DTIC), и в то же время ее чувствительность к BCNU была наиболее высокой среди исследованных линий (рис. 1А–Б). Напротив, меланома Mel-Rac была максимально чувствительна к дакарбазину (рис. 1А) и наиболее резистентна к цитотоксичности BCNU и ACNU (рис. 1Б–В). Добавление Альнорина существенно повышало цитотоксичность DTIC в отношении клеток Mel-II, но не Mel-Rac. Индекс стимуляции токсичности (ИСТ), представляющий собой соотношение ЦД₅₀ препарата в присутствии и отсутствии Альнорина, равнялся для линии Mel-II 6,5 и 7,5 при концентрациях Альнорина 500 и 50 МЕ/мл ($p \leq 0,05$) соответственно и лишь 1,64 и 1,96 в отношении клеток Mel-Rac. Альнорин также существенно усиливал цитотоксичность DTIC в отношении другой резистентной линии Mel-Mtr – в 6,25 и 4,18 раза ($p \leq 0,05$), и лишь в слабой степени в отношении клеток чувствительной линии Mel-P – в 1,5 и 2 раза. Однако на достаточно резистентных линиях Mel-IS и Mel-Kop усиление цитотоксического действия DTIC альнорином проявлялось лишь в слабой степени. Сходные закономерности обнаружены и для BCNU и ACNU: Альнорин усиливал цитотоксическое действие BCNU только в отношении резистентных линий Mel-Rac и Mel-P (рис. 1Б) и ACNU в отношении Mel-Rac (ACNU; рис. 1В), и действовал очень слабо или вовсе не влиял на цитотоксичность препаратов на чувствительных линиях. Усиливающее цитотоксичность Дакарбазина действие Альнорина проявлялось на клетках меланом Mel-II и Mel-Mtr преимущественно в отношении более низких концентраций DTIC – от 125 до 500 мкг/мл и не проявлялось при максимальной его концентрации 1 000 мкг/мл. (рис. 2А–Б).

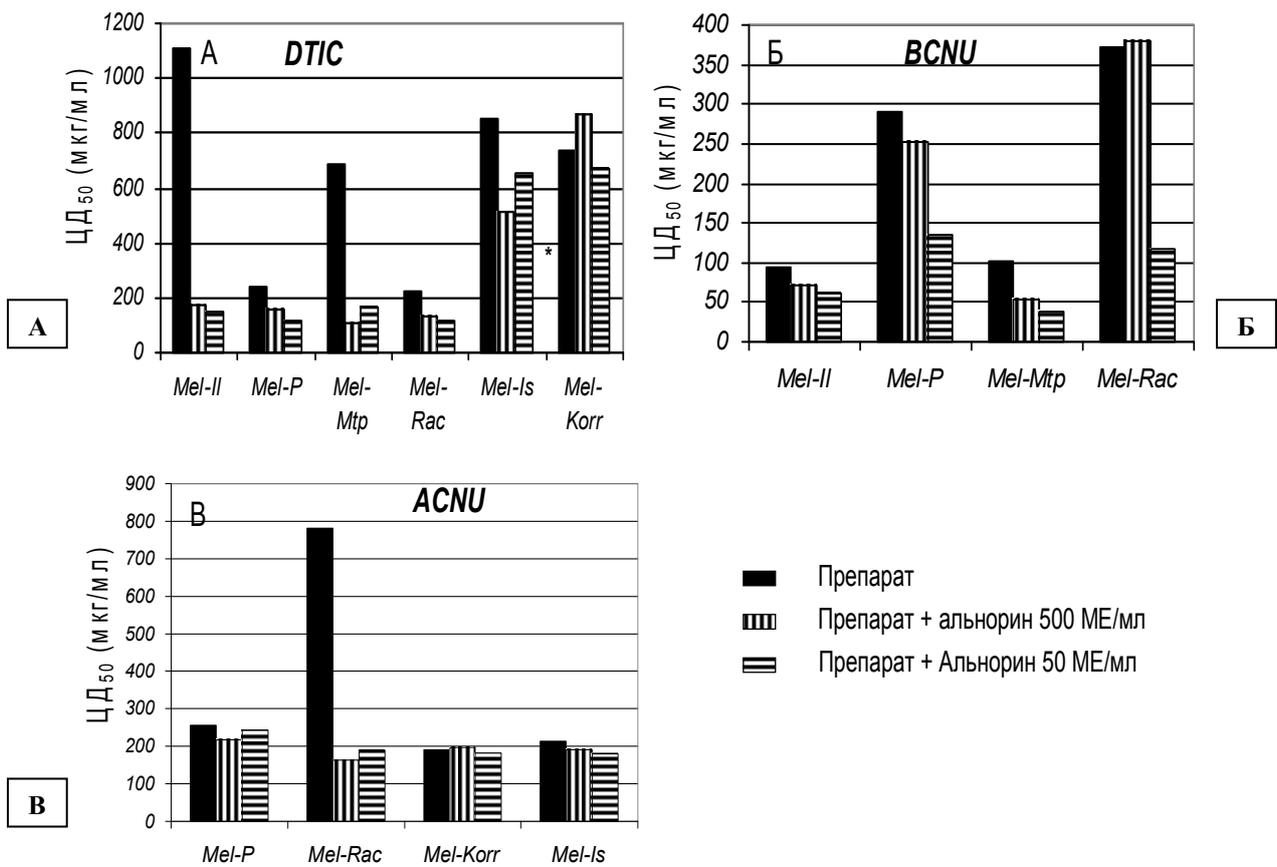


Рис. 1А-В. Эффект ФНО-α (Альнорин) на цитотоксичность DTIC, BCNU и ACNU в клетках меланом.

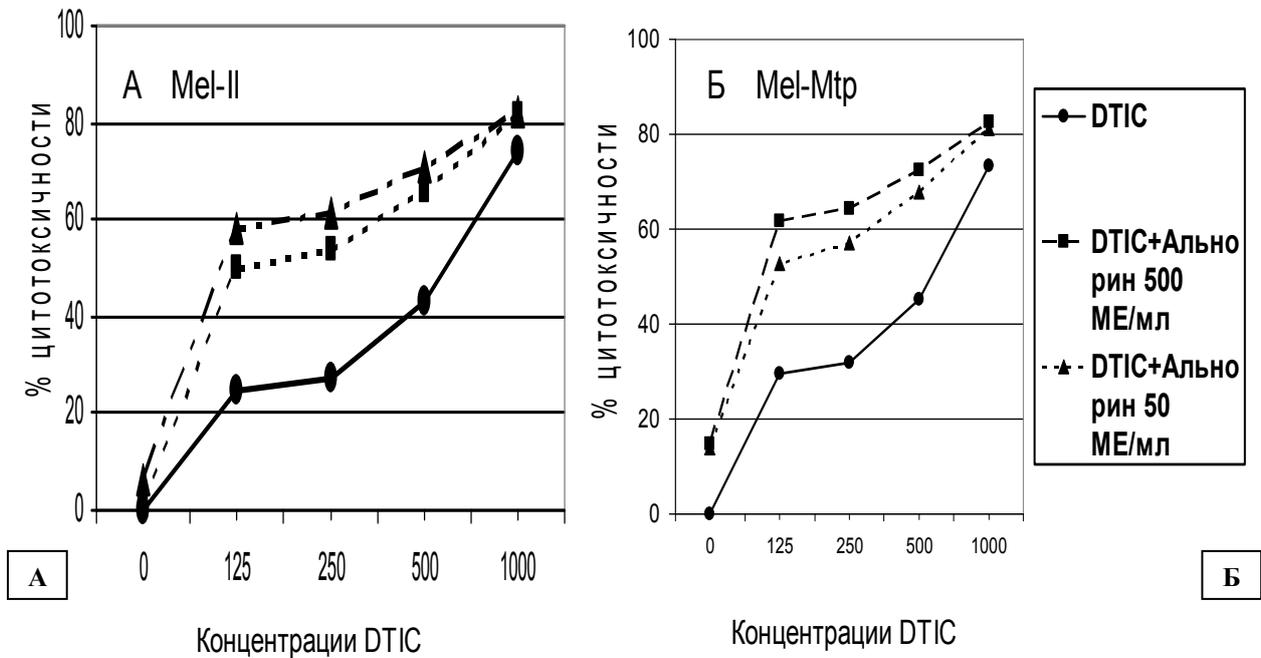


Рис. 2А-Б. Эффект ФНО-α (Альнорин) на цитотоксичность DTIC в клетках меланом.

Таблица 1

Сравнительная цитотоксичность противоопухолевых лекарств в клетках линий меланом: эффект Альнорина

Линии меланом	ЦД ₅₀ (мкг/мл)								
	DTIC			BCNU			ACNU		
	Альнорин								
	–	500 МЕ/мл	50 МЕ/мл	–	500 МЕ/мл	50 МЕ/мл	–	500 МЕ/мл	50 МЕ/мл
Mel-IL	1109,7±312,8	170,3±66,5*	148,15±59,3*	94,08±18,8	71,25±12,4	61,01±11,02	–	–	–
Mel-Mtp	684,28±21,5	109,4±52,13*	163,55±58,0*	100,18±23,5	53,88±12,6	38,54±7,6*	–	–	–
Mel-P	238,0±22,4	155,3±17,9*	119,95±24,7*	289,87±58,64	253,53±55,24	133,93±49,36	256,35 39,0	217,5 48,6	243,6 49,1
Mel-Rac	221,52±33,94	135,14±25,6*	112,8±27,32*	373,18±91,17	378,47±121,37	116,0±46,69	782,07 42,8	164,9 62,01*	189,7 70,7*
Mel-Korr	737,7±236,4	871,032±218,8	674,4±189,8	–	–	–	191,0±13,3	196,0±5,0	182,4±6,8
Mel-Is	852,0 250,1	510,4 131,4	655,1 210,4	–	–	–	212,96 25,2	191,9 5,2	180,7 13,7
* p≤0,05									

Как на чувствительных, так и резистентных клеточных линиях Альнорин в большинстве случаев был более эффективным в концентрации 50 МЕ/мл, чем 500 МЕ/мл. Интерфероны α и γ не проявили аналогичной активности (данные не приводятся). Влияние Альнорина на индукцию апоптоза в клетках меланом противоопухолевыми лекарствами.

Среди 4 линий меланом, исследованных на индукцию апоптоза дакарбазином, клетки меланом Mel-II и Mel-Mtp оказались наиболее резистентными так же, как и к цитотоксическому действию. Альнорин в концентрации 500 МЕ/мл усиливал индукцию апоптоза в клетках меланомы Mel-II, снижая 50%-ную апоптозиндуцирующую дозу DTIC в 35,8 раза, а в концентрации 50 МЕ/мл – в 62,4 раз. Клетки меланом Mel-Rac и Mel-P, максимально чувствительные к цитотоксическому действию дакарбазина, были также чувствительны и к его апоптозиндуцирующему эффекту, и Альнорин его не усиливал (рис. 3). Усиление апоптоза в клетках меланомы Mel-Mtp Альнорином в концентрациях 500 и 50 МЕ/мл в 32,5 и 11,4 раз соответственно при оценке по 50%-ной апоптозиндуцирующей дозе (рис. 3), на самом деле представляла собой простую сумму эффектов DTIC и Альнорина, т.к. Альнорин сам индуцировал в этих клетках высокий уровень апоптоза (рис. 4B), чего не было на клетках Mel-II и Mel-Rac (рис. 4A-B). Клетки меланомы P, резистентные к цитотоксическому эффекту DTIC, оцениваемому по IC_{50} , хотя и погибли в значительной мере в результате этого эффекта после 24 и 48 ч экспозиции с препаратом, но в этот период только в слабой мере проявляли признаки апоптоза (25,35 и 13 % соответственно). Только через 72 ч 41,4 % клеток проявляли признаки апоптоза (рис. 5). Индукция апоптоза BCNU так же, как и цитотоксичность препарата проявлялась максимально на клетках меланом линий Mel-II и Mel-Mtp, а клетки линии Mel-Rac были резистентны к обоим эффектам.

Однако Альнорин не усиливал апоптоз, индуцированный BCNU ни на чувствительных, ни на резистентной линии (рис. 6 и 7A–Г). Так же, как и с дакарбазином Альнорин существенно снижал 50 %-ную апоптотическую дозу BCNU на клетках меланомы Mel-Mtp, но и в этом случае это была лишь сумма эффектов, как и в опытах с DTIC, т.к. сам Альнорин, как указывалось выше на рис. 4B, индуцировал в этих клетках высокий уровень апоптоза. При определении апоптоза на нефиксированных клетках Аннексином-V и пропиридиумом иодида, т.е. раздельного тестирования раннего и позднего апоптоза, в клетках меланомы Mel-Rac Альнорин, не усиливая индукцию общего апоптоза дакарбазином, в некоторой степени усиливал поздний, но не ранний апоптоз (рис. 4B). Однако он не влиял на индукцию BCNU в клетках этой меланомы ни общего, ни раннего или позднего апоптоза. При этом на этих клетках при 24–48-часовой инкубации с BCNU ранний апоптоз был более интенсивным, чем поздний (рис. 7Г) в отличие от клеток Mel-II (рис. 7A), а также в отличие от тех же клеток под воздействием DTIC (рис. 4B).

Заключение

Таким образом, можно заключить, что клетки меланом, происходящие от разных больных, отличаются различной чувствительностью к цитотоксическому и апоптозиндуцирующему действию противоопухолевых лекарств, и фактор некроза опухолей (Альнорин) усиливает эту чувствительность только на резистентных, но не на чувствительных клетках. Причины различной чувствительности меланом к лекарствам и к эффекту ФНО не ясны. Возможно, это связано с неодинаковой экспрессией в клетках отдельных меланом генов, контролирующих процессы апоптоза. Это еще предстоит изучить.

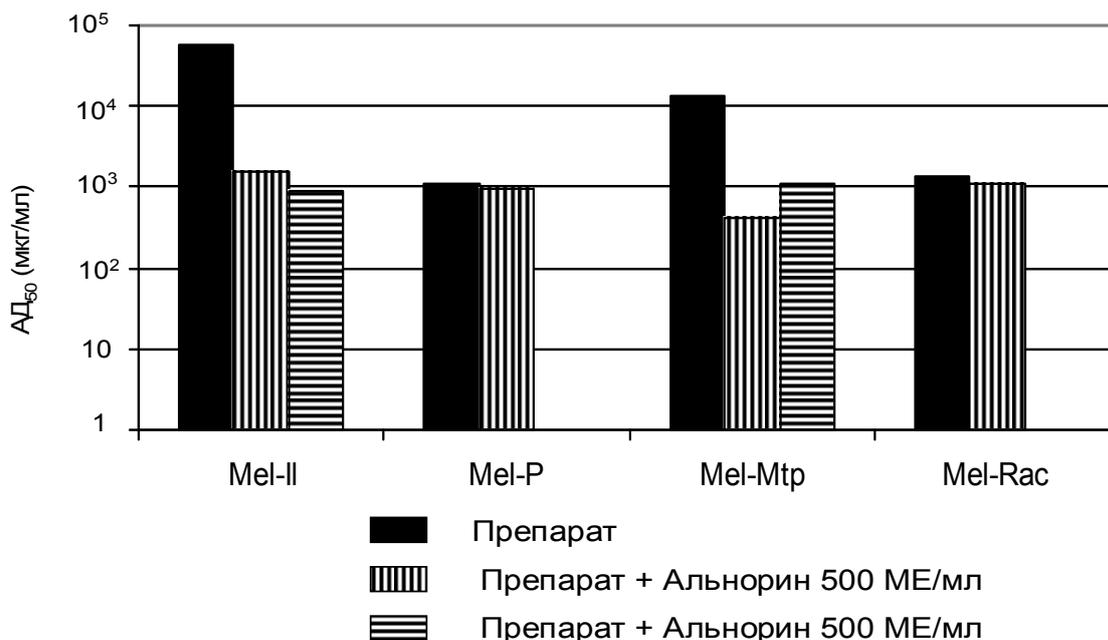


Рис. 3. Эффект ФНО-α (Альнорин) на индукцию апоптоза DTIC в клетках меланом.

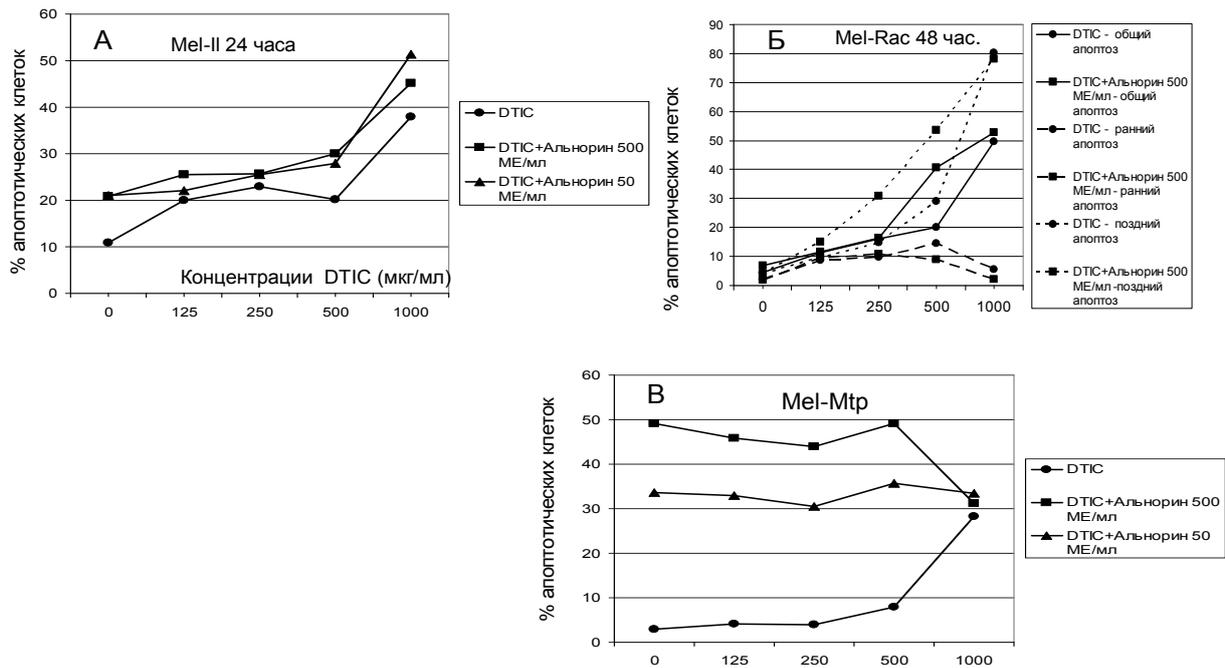


Рис. 4А-В. Индукция апоптоза в клетках меланом дакарбазином (DTIC) влияние Альнорина.

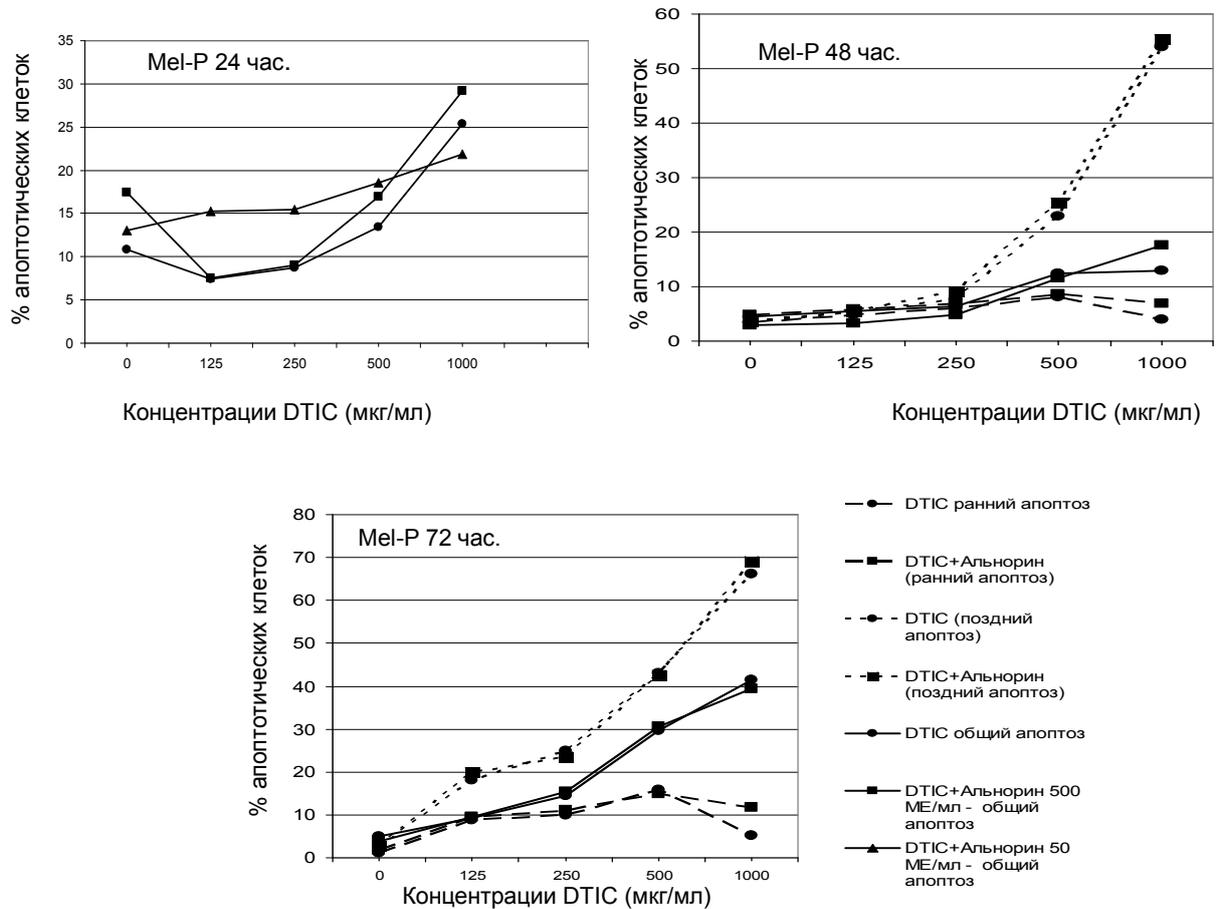


Рис. 5А-В. Влияние Альнорина на индукцию апоптоза дакарбазином (DTIC) в клетках меланомы Mel-P: зависимость от продолжительности экспозиции.

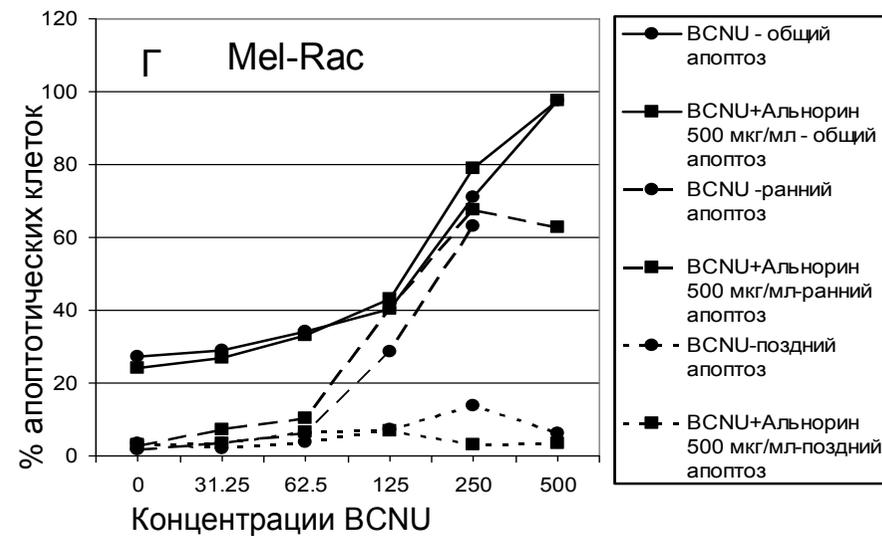
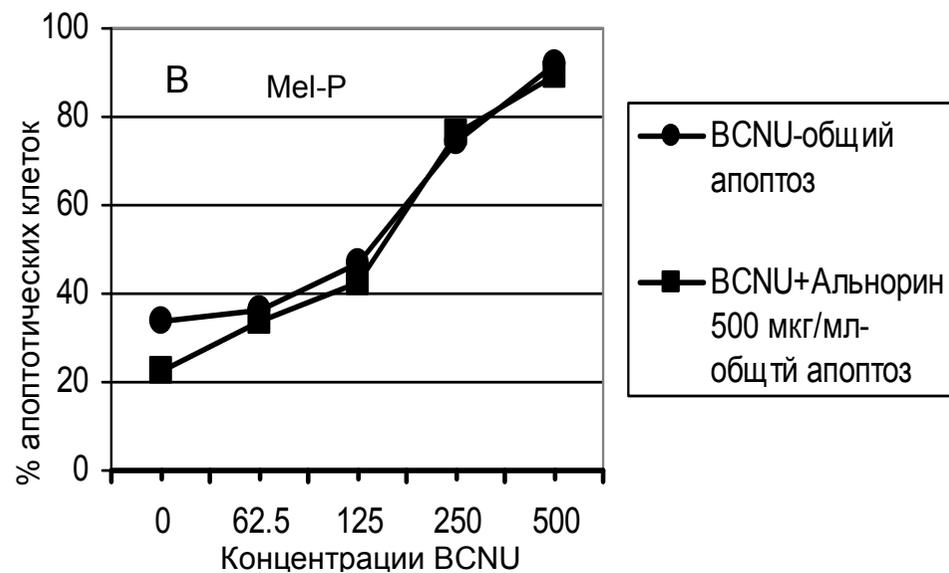
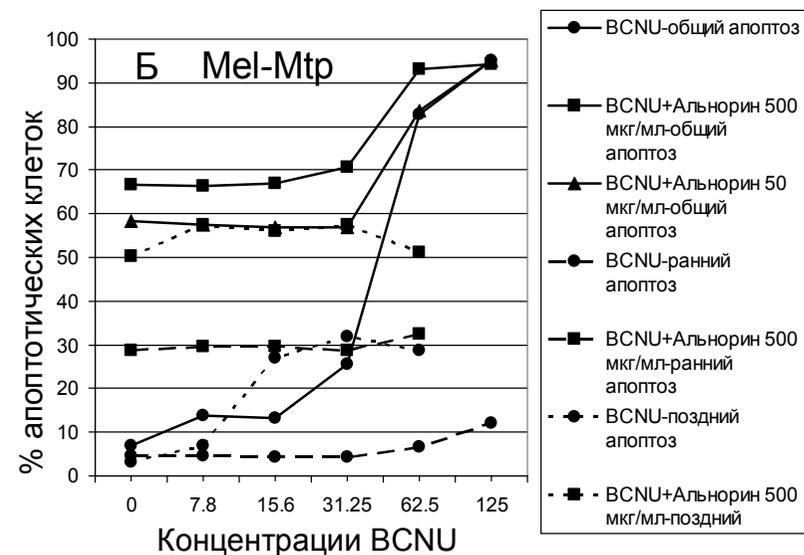
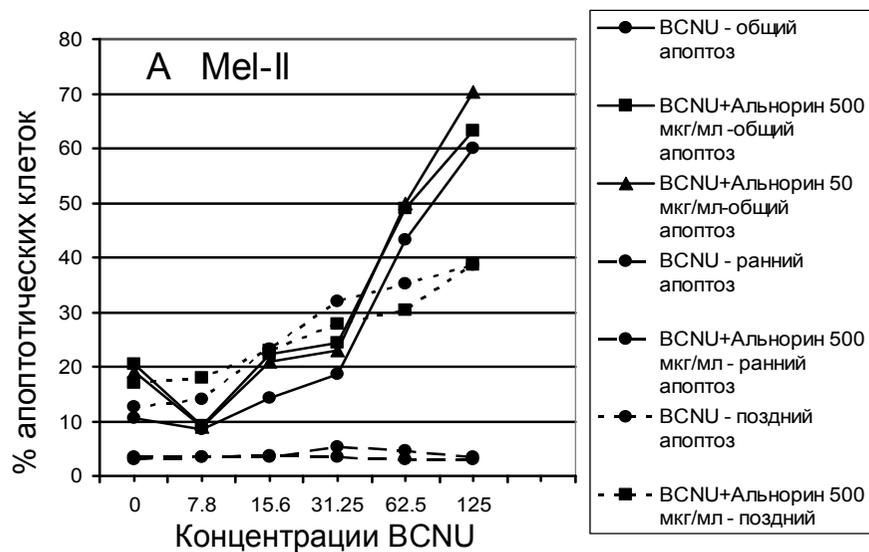


Рис. 7А-Г. Индукция апоптоза в клетках меланом BCNU: влияние Альнорина.

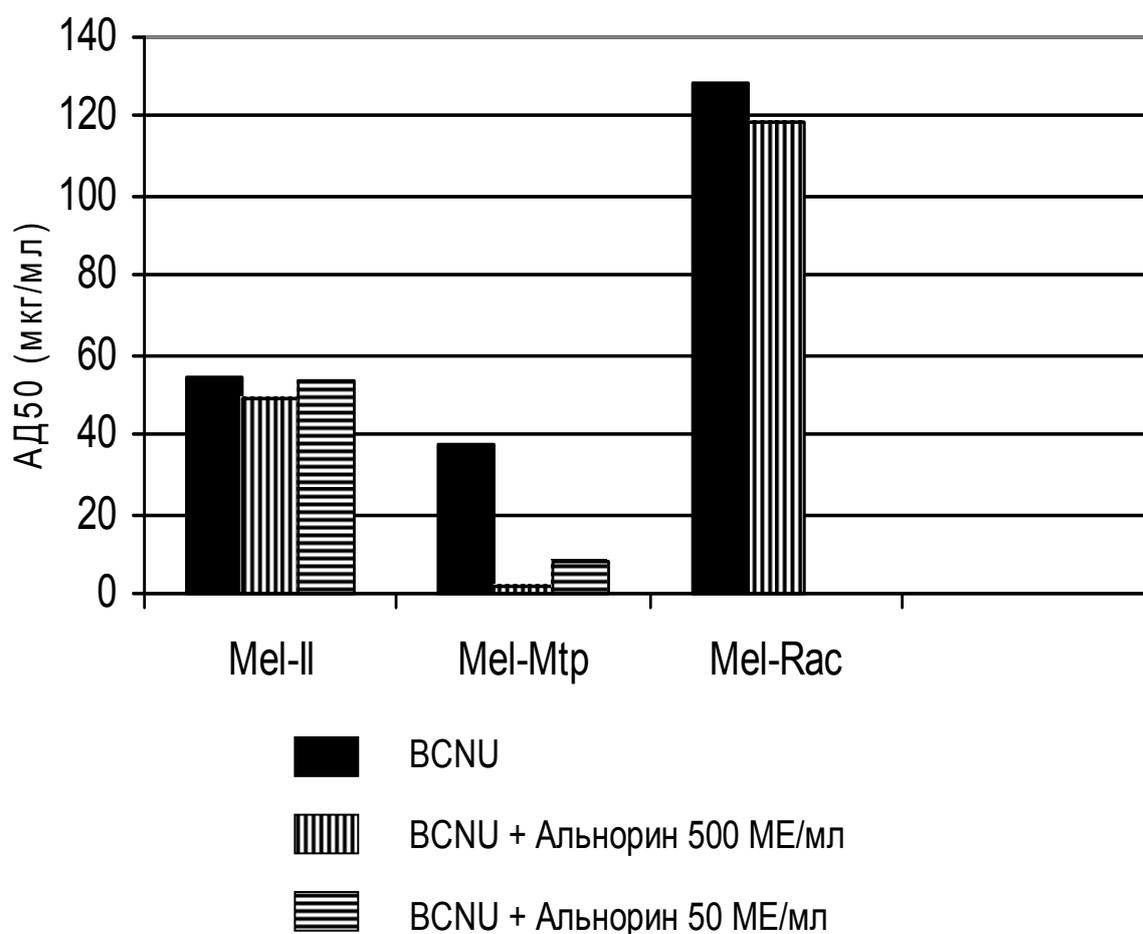


Рис. 6. Эффект ФНО-α (Альнорин) на индукцию апоптоза BCNU к клеткам меланом.

Литература

1. Славина Е.Г., Черткова А.И., Короткова О.В. и др. Модуляция интерфероном-α цитотоксичности и индукции апоптоза доксорубицином и 5-фторурацилом // Иммунология. – 2005. – Т. 26, № 1. – С. 16–9.
2. Aggarwal B.B. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword // Nat.Rev.Immunol. – 2003. – 3. – P. 745–56.
3. Balkwill F.R., Ward B.G., Moodie E., Fiers W. Therapeutic potential of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon in experimental human ovarian cancer // Cancer Res. – 1987. – 47. – P. 4755–8.
4. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors // Proc. Nat. Acad. Sci USA. – 1975. – 72. – P. 3666–70.
5. Haranaka K., Sakurai A., Saromi N. Antitumor activity of recombinant human tumor necrosis factor in combination with hyperthermia, chemotherapy, or immunotherapy // J. Biol. Response Med. – 1987. – 6. – P. 379–91.
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // J.Immunol.Meth. – 1983. – 65(1–2). – P. 55–63.
7. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. et al. A rapid and simple methods for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // J.Immunol.Meth. – 1991. – 139. – P. 271–280.
8. Oettgen H.F., Carswell E.A., Kassel R.L. et al. Endotoxin-induced tumor necrosis factor // Recent Results Cancer Res. – 1980. – 75. – P. 207–12.
9. Xia Wang, Yong Lin. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? // Acta Pharmacol.Sin. – 2008. – Vol. 29(11). – P. 1275–88.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-01598.

УДК 616.24-006.6-092.9:615.277.3

*О.В. Калинина¹, Б. А. Фролов¹, А. А. Штиль², Н.М. Перетолчина², З.С. Смирнова²***ВЛИЯНИЕ МИЛИАЦИНА НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ МЕТОТРЕКСАТА НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС**¹Оренбургская государственная медицинская академия, Оренбург²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация:**

Калинина Ольга Вячеславовна, ассистент кафедры патологической физиологии

адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Советская, д. 6; тел. +7(3532)-77-96-07, факс +7(3532)-77-55-72

e-mail: olgakalina78@mail.ru

Статья поступила 27.05.2009, принята к печати 20.10.2009

Резюме

В эксперименте, выполненном на 63 мышах-самцах гибридов I поколения BDF₁ (C57Bl/6×DBA/2), на модели перевиваемой карциномы легких Льюис изучено влияние тритерпеноида растительного происхождения – милиацина – на противоопухолевую активность метотрексата.

Установлено, что милиацин уменьшает токсическое действие метотрексата на организм мышей с опухолью LLC и повышает терапевтическую эффективность цитостатика по критериям торможения роста эпидермоидной карциномы легких и увеличения продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными животными.

Ключевые слова: метотрексат, тритерпеноиды, милиацин, карцинома легких Льюис.*O.V. Kalinina¹, B.A. Frolov¹, A.A. Shtil², N.M. Peretolchina², Z.S. Smirnova²***THE INFLUENCE OF MILIACIN ON ANTITUMORIGENIC ACTIVITY OF METOTREXATE ON THE MODEL OF TRANSPLANTED LLC**¹Orenburg Medical Academy, Orenburg²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

We have studied the influence of triterpenoid of the plant origin – miliacin – on the antitumor activity of metotrexate in the experiment on the 63 mice – males of the hybrids of the 1st generation BDF₁ (C57Bl/6×DBA/2) on the model of the transplanted carcinoma.

It was obtained that miliacin decreases the toxic effect of metotrexate in mice with the tumor LLC and increases the therapeutic effectiveness of citostatic according to the criteria of inhibition of growth of epidermoid lung carcinoma and the increasing life span of experimental animals in comparison with control ones.

Key words: methotrexate, triterpenoids, miliacin, lung Luice carcinoma.**Введение**

Химиотерапия злокачественных опухолей является одним из основных методов лечения онкологических больных, однако применение противоопухолевых препаратов сопровождается выраженными побочными эффектами из-за их низкой избирательности действия [1; 7; 8]. Химиопрепараты оказывают повреждающее действие как на опухолевые, так и на нормальные клетки и ткани организма – костный мозг, лимфоидные органы, эпителий полости рта и желудочно-кишечного тракта, печень, волосяные фолликулы, репродуктивные органы. Как следствие указанных особенностей действия химиопрепаратов на организм к их побочным эффектам следует отнести миелодепрессию, диспептические расстройства, подавление реакций гуморального и клеточного иммунитета, функций репродуктивных органов, печени, алопецию. В связи с этим разработка подходов, направленных на уменьшение побочных эффектов химиотерапии, является актуальной задачей. В частности, для решения этой задачи используются тритерпеновые соединения [2; 5; 10], обладающие широким спектром фармакологических свойств. К числу таких соединений относится милиацин, для которого показано выраженное иммунопротекторное и гепатопротекторное действие при использовании в комбинации

с метотрексатом (MTX) [4; 6]. Вместе с тем, уменьшение риска побочных эффектов химиотерапии может представлять практический интерес лишь в случае, если тритерпеноид не снижает противоопухолевого действия цитостатика. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилась оценка влияния милиацина на противоопухолевый эффект MTX на эпидермоидной карциноме легких мышей.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 63 мышах-самцах гибридов I поколения BDF₁ (C57Bl/6×DBA/2), полученных из питомника РАМН «Столбовая», массой 20–22 г. В качестве модели использовали перевиваемую эпидермоидную карциному легких Льюис.

Штамм карциномы Льюис получен из лаборатории экспериментальной терапии метастазов НИИ ЭДитО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и поддерживался путем внутримышечных перевивок на мышах-самцах линии C57Bl/6. Для проведения эксперимента опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 (1:10) и по 0,5 мл полученной суспензии (~50 мг опухолевой массы) вводили п-к в область правой подмышечной впадины мышам-самцам BDF₁. В работе использован штамм LLC третьего пассажа [11].

После трансплантации опухолевых клеток LLC животные были разделены на четыре группы:

I – мыши (18 жив.) нелеченные (контроль);

II – мыши (15 жив.), получавшие через 48 ч после инокуляции опухоли внутрибрюшинно однократно МТХ (фирма Эбеве, Австрия) в дозе 10 мг/кг;

III – мыши (15 жив.), получавшие через 48 ч после перевивки опухоли МТХ с последующим 3-кратным введением растворителя милиацина – твина-21 в 0,9 %-ном р-ре хлорида натрия ($1,6 \times 10^{-7}$ моль/кг);

IV – мыши (15 жив.), получавшие через 48 ч после перевивки опухоли МТХ с последующим 3-кратным введением милиацина.

Милиацин и растворитель вводили внутрибрюшинно через 60 мин, 24 и 48 ч после введения МТХ.

Милиацин получен из кристаллов просяного масла, выпадающих при его отстаивании на холоду. Очистку препарата проводили его перекристаллизацией из хлороформа. На основании масс-спектрометрии, данных ЯМР и ИК-спектроскопии, анализа хроматографической однородности и качественного состава выделенный препарат (рис. 1) отнесен к группе пентациклических тритерпеноидов, имеющих структуру 3-β-метоксигерманицена [9].

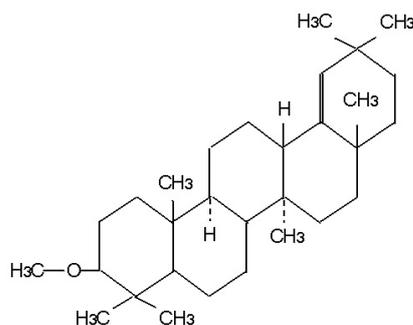


Рис. 1. Химическая структура пентациклического тритерпеноида – милиацина (3β-метокси- 18-олеанена).

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили [11]:

Торможение роста опухоли (ТРО)

Измеряли три максимальных взаимно перпендикулярных размера опухоли: длина (L), ширина (S), высота (H) у каждого животного и вычисляли объем (V)

$$V(\text{мм}^3) = L \times S \times H$$

и средний объем опухоли в группе. Измерение параметров опухоли проводили на 5; 7; 12; 17 и 19 сутки после введения МТХ.

Торможение роста опухоли вычисляли по формуле:

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

V_k – средний объем (мм^3) опухолей в нелеченной группе (I); V_o – средний объем опухолей (мм^3) в сравниваемых леченных группах (II, III, IV).

Увеличение продолжительности жизни (УПЖ)

Сравнительную оценку противоопухолевого эффекта по продолжительности жизни нелеченных животных и животных сравниваемых леченных групп (II; III; IV) проводили после гибели всех жи-

вотных от опухолевого процесса, вычисляя среднюю продолжительность жизни (дни).

Увеличение продолжительности жизни рассчитывали по формуле:

$$\text{УПЖ}(\%) = \frac{\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k}{\text{СПЖ}_k} \times 100, \text{ где}$$

СПЖ_к – средняя продолжительность жизни животных в нелеченной группе, СПЖ_о – средняя продолжительность жизни животных в леченных группах.

Минимальные критерии активности:

1. торможение роста опухоли $\geq 50\%$;
2. увеличение продолжительности жизни $\geq 25\%$.

Токсичность препаратов оценивали по ранней гибели мышей в леченных группах по сравнению с гибелью нелеченных животных.

Результаты обрабатывали с использованием непараметрического критерия χ^2 и критерия Стьюдента [3]. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ динамики роста LLC (рис. 2) свидетельствует о том, что во всех группах у животных, получавших МТХ (II; III; IV), препарат вызывал замедление роста опухолей.

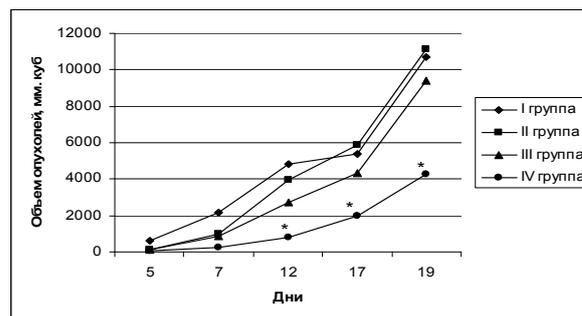


Рис. 2. Динамика роста опухоли LLC в исследуемых группах животных. * $p < 0,05$ достоверность по отношению к I группе.

Однако, если у животных, получавших только МТХ (группа II) или МТХ с растворителем (группа III), значимое ТРО наблюдали лишь на протяжении 7 суток после введения МТХ (ТРО = 77 %, 54 % и 83 %, 59 %, соответственно) (табл. 1), то у мышей IV группы, которым вводили МТХ + милиацин, значимое ТРО отмечали в течение всего периода наблюдения (ТРО = 91 %, 89 %, 84 %, 63 %, 60 % соответственно срокам измерения опухоли). Следует отметить, что даже на 19 сутки после лечения ТРО у мышей IV группы сохранялось высоким и соответствовало таковому у животных II и III групп на 7 сутки после введения МТХ.

МТХ оказывал выраженное токсическое действие, вызывая гибель 33 % мышей (группа II) в течение первых 5 суток (табл. 2). При этом введение МТХ+растворителя (группа III) не оказывало влияния на токсичность МТХ. В то же время, милиацин (группа IV) существенно уменьшал токсическое действие МТХ, снижая показатель гибели мышей (по сравнению с группой II) в 2,5 раза. Эти результаты соответствуют ранее полученным данным [12] о защитном влиянии милиацина в условиях экстремальных воздействий на организм, включая воздействие токсических факторов.

Таблица 1

Влияние милиацина на противоопухолевый эффект метотрексата у мышей с LLC

№ группы	Вводимые препараты	ТРО,%					УПЖ,%
		Дни после введения метотрексата					
		5	7	12	17	19	
II	MTX	77*	54*	19**	0**	0**	9
III	MTX+растворитель	83*	59*	43***	13***	12***	0
IV	MTX+милиацин	91*	89*	84*	63*	60*	36

* p<0,05 – достоверные отличия относительно нелеченной группы (I);
 **p<0,05 – достоверные отличия относительно IV группы;
 ***p<0,05 – достоверные отличия относительно IV группы.

Таблица 2

Влияние милиацина на токсичность метотрексата у мышей BDF₁ с трансплантированной LLC

№ Группы	Группа животных	n животных в группе	Выживаемость животных в первые 5 суток после введения MTX		Гибель от токсичности, %
			Погибшие (абс)	Выжившие (абс)	
I	Контроль	18	0	18	0
II	MTX	15	5	10	33
III	MTX+растворитель	15	4	11	27
IV	MTX+милиацин	15	2	13	13

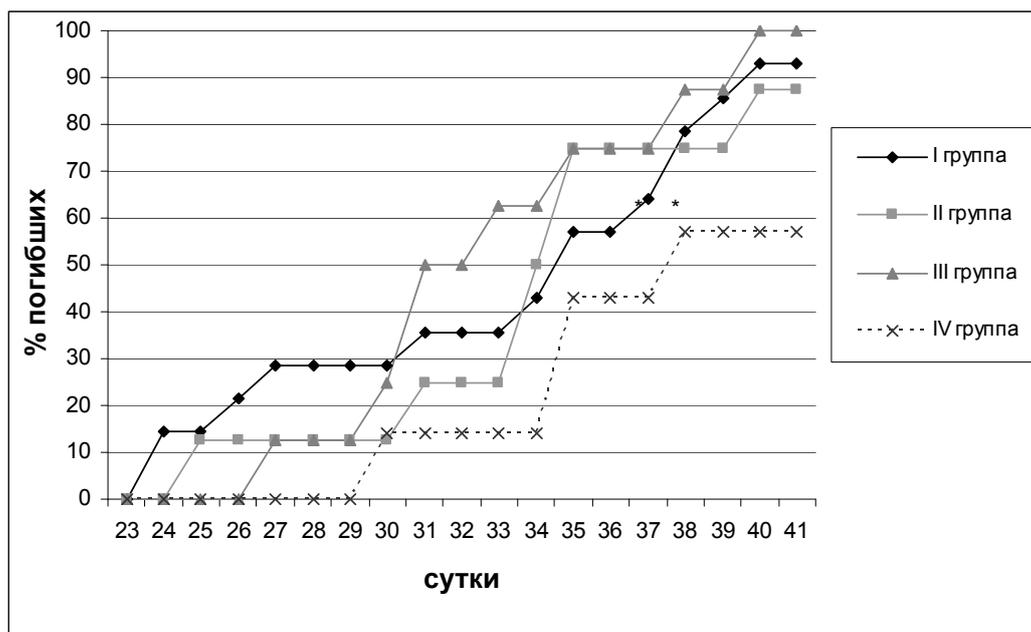


Рис. 3. Динамика гибели мышей BDF₁ в исследуемых группах животных с LLC в интервале с 23 по 41 сутки после трансплантации опухоли: *p<0,05 достоверность по отношению к I группе.

Снижение токсического действия МТХ под влиянием милиацина позволило получить высокий противоопухолевый эффект у выживших мышей (IV группа), леченных МТХ с последующим 3-х кратным введением милиацина.

Действие МТХ в комбинации с милиацином увеличило продолжительность жизни мышей, в среднем, на 36 % по сравнению с нелечеными животными (рис. 3), при этом значение УПЖ в этой группе мышей (см. табл. 1) было выше минимального статистически значимого критерия (25 %).

В то же время у мышей II и III групп не выявлено увеличения продолжительности жизни мышей с LLC: 9 % и 0 % соответственно.

Таким образом, 3-кратное применение милиацина после введения МТХ повышает противоопухолевую эффективность МТХ в отношении карциномы легких LLC, снижая при этом острую летальную токсичность МТХ.

Полученные данные позволяют считать милиацин эффективным органопротектором [4; 6], не снижающим противоопухолевую активность МТХ.

Литература

1. Ветошкина Т.В., Дубская Т.Ю., Гольдберг В.Е. Ранние и отдаленные последствия токсического действия на печень противоопухолевого препарата платины // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1997. Т. 60, № 4. С. 57–9.
2. Гольдберг Е.Д., Амосова Е.Н., Зуева Е.П. и др. Повышение эффективности химиотерапевтического и хирургического методов лечения перевиваемых опухолей препаратами солодки // Бюлл. эксп. биол. мед. 2008. Т. 145, № 2. С. 213–7.
3. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Ленинград: Медицина, 1973. – 141 с.
4. Железнова А.Д., Железнов Л.М., Штиль А.А. и др. Морфологические проявления защитного влияния милиацина в органах иммуногенеза при действии метотрексата // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2007. Т. 144, № 10. С. 458–63.
5. Жукова Н.А., Семенов Д.Е., Сорокина И.В. и др. Влияние бетулоновой кислоты и ее производного [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислоты на структуру печени мышей с лимфомой RLS // Бюлл. эксп. биол. мед. 2005. Т. 140, № 9. С. 348–51.
6. Калинин О.В., Красиков С.И., Шехтман А.М. и др. Гепатопротекторное действие милиацина при токсическом поражении печени метотрексатом // Российский биотерапевтический журнал. 2009. Т. 8, № 1. С. 48–54.
7. Кинзирская Ю.А., Богуш Т.А., Остапчук Н.В. и др. Гепатотоксическое действие лекарственных препаратов некоторых фармакологических групп // Клиническая медицина. 2003. № 10. С. 11–6.
8. Молодых О.П., Лушикова Е.Л., Клиникова М.Г. и др. Структурная реорганизация печени крыс при цитотоксическом действии доксорубина // Бюлл. эксп. биол. мед. 2006. Т. 141, № 5. С. 579–85.
9. Олифсон Л.Е., Осадчая Н.Д., Нузов Б.Г. и др. Химическая природа и биологическая активность милиацина // Вопросы питания. 1991. № 2. С. 57–9.
10. Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н. и др. Глицам как средство повышения эффективности химиотерапии и хирургического метода лечения экспериментальных опухолей // Вопросы онкологии. 1999. Т. 45, № 5. С. 554–6.
11. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 637–74.
12. Фролов Б.А., Панфилова Т.В., Штиль А.А. и др. Милиацин как иммунопротектор. Механизмы защитного влияния при иммуносупрессии в условиях воздействия на организм дестабилизирующих факторов: Актуальные вопросы теоретической и клинической медицины. Сборник научных трудов Оренбургской медицинской академии (Том XXXI). Под ред. проф. Б.А. Фролова. – Оренбург, 2005. – С. 167–9.

Выводы

1. Тритерпеноид растительного происхождения милиацин повышает терапевтическую эффективность МТХ, и их сочетанное применение вызывает высокое торможение роста LLC в течение 12 дней после введения цитостатика – ТРО = 91–84 %, а также статистически значимое ТРО сохраняется в течение длительного периода наблюдения (на 19 сутки ТРО=60 %)
2. МТХ в сочетании с милиацином увеличивают продолжительность жизни мышей с LLC на 36 %, в то время как МТХ в монотерапии – на 9 %.
3. МТХ в дозе 10 мг/кг при однократном в/б введении оказывает токсическое действие на мышей BDF₁ с LLC, вызывая гибель 33 % жив. в течение первых 5 суток после его применения.
4. Милиацин уменьшает токсическое действие МТХ на организм мышей с опухолью LLC, снижая гибель животных до 13 %.

УДК 615.277.3.015.46:616-092.9

Э.Г. Щербачева¹, В.М. Бухман², Е.Б. Исакова³, Н.Н. Липатов⁴**СТИМУЛЯЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА
СОЧЕТАНИЕМ НИЗКОДОЗОВОГО ЦИКЛОФOSФАМИДА
С ПЕРОРАЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ ЛИЗОЦИМА И НУКЛЕИНАТА НАТРИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**¹Российская медицинская академия последипломного образования, Москва²РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва³НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва⁴НИИ Детского Питания РАСХН, МО**Контактная информация:**

Бухман Владимир Михайлович, заведующий лабораторией фармакологии и токсикологии

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)-324-22-44; моб. +7(916)-410-20-42

e-mail: bukhman@mail.ru

Статья поступила: 26.06.2009, принята к печати 20.10.2009.

Резюме

Длительное, на протяжении 6 нед., введение через рот комбинации нуклеината натрия (низкомолекулярная РНК из пекарских дрожжей) с лизоцимом белка куриных яиц значительно усиливает резистентность обработанных низкодозовым циклофосфамидом (100 мг/кг, в/бр, однократно) мышей-гибридов (C57Bl/6J×DBA2)F1 к трансплантатам Т-клеточной лимфомы EL4 (полусингенная система). Более пожилые, 4-месячные мыши, проявили большую резистентность и лучше отвечали на лечение по сравнению с более молодыми мышами 2-месячного возраста.

Ключевые слова: низкодозовый циклофосфамид, лизоцим белка куриных яиц, нуклеинат натрия, противоопухолевая резистентность, мыши.

*E. G. Shcherbakova¹, V. M. Bukhman², E. B. Isakova³, N. N. Lipatov⁴***STIMULATION OF THE HOST ANTITUMOR RESISTANCE
BY COMBINATION OF LOW-DOSE CYCLOPHOSPHAMIDE WITH LYSOZYME
AND NUCLEONATE NATRY IN EXPERIMENTAL MODEL**¹Russian Medical Academy of Prolonged Education, Moscow²N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow³Gause Institute of New Antibiotic, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow⁴Institute of Baby Feeding, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow Region**Abstract**

Long-continued, throughout 6 weeks, oral administration of a combination sodium nucleinate (low-molecular RNA from baking yeast) with lysozyme of the chicken egg white considerably intensifies resistance of mice-hybrids (C57Bl/6J DBA2)F1 to transplants T-cell lymphoma EL4 (semisynthetic system) treated with low dose of cyclophosphamide (single injection of 100 mg/kg, ip). More elderly, 4 monthly mice, have shown the increased resistance and they better respond to the treatment in comparison with younger mice of 2 monthly age.

Key words: low dose of cyclophosphamide, lysozyme of the chicken egg white, sodium nucleinate, antitumor resistance, mice.

Введение

Одним из актуальных направлений улучшения результатов лечения онкологических пациентов является иммунотерапия. Среди средств иммунотерапии существенное место принадлежит биологически активным веществам, проявляющим иммуномодулирующую активность.

В частности перспективным представляется разработка методов усиления противоопухолевой резистентности организма путем комбинирования препаратов, угнетающих супрессорные механизмы, с препаратами, активирующими эффекторные звенья противоопухолевого иммунитета. Ниже мы приводим результаты опытов, демонстрирующих возможность повышения противоопухолевой резистентности организма с помощью сочетания антисупрессорной обработки организма мышей циклофосфамидом с длительным введением лизоцима белка куриных яиц и нуклеината натрия (натриевая соль низкомолекулярной РНК из пекарских дрожжей).

Материалы и методы**Животные**

Самцы мышей линии C57Bl/6J (B6) и гибридов (C57Bl/6J×DBA/2)F1 (B6D2F1), разводки питомника РАМН «Крюково». Мыши содержались в клетках по 5–10 голов, получали стандартную диету и имели свободный доступ к воде.

Опухоль

В работе использован штамм перевиваемой Т-клеточной лимфомы EL4, который был получен из Т-клеточной лимфомы, индуцированной ДМБА у мыши линии B6 в 1947 г [6]. Штамм хранится в азотном банке при $t = -196$ °С. После размораживания штамм поддерживали в сингенных условиях, в асцитной форме серийными, каждые 10 суток, внутривенными (в/бр) пассажами асцитных опухолевых клеток (по 0,2 мл разведенного в 100 раз асцита) на мышцах чистой линии B6. В опытах мышам B6D2F1 вводили по 5×10^4 асцитных опухолевых клеток в/бр в день 0.

Препараты

Для введения животным использовали коммерческие препараты: лизоцим гидрохлорид (ЛИЗ) фирмы «Belovo» (Бельгия), нуклеинат натрия (НН) фирмы «БИОСИНТЕЗ, ОАО» (Россия) и циклофосфан-ЛЭНС (циклофосфамид, ЦФ) фирмы «ЛЭНС-ФАРМ» (Россия). Препараты растворяли и разводили в воде и/или физиологическом растворе NaCl непосредственно перед введением. Внутривенное введение ЛИЗ и НН проводили через рот с помощью приготовленного из инъекционной иглы изогнутого зонда. Пути введения, дозы, схемы, режимы в конкретных опытах даны в разделе «Результаты».

Параметры оценки эффекта

Противоопухолевый эффект оценивали по принятым в экспериментальной онкологии параметрам – выживаемости, а также доле вылеченных мышей и изменению массы тела. Последний параметр прямо коррелирует с накоплением асцита, хотя на нем отражаются и проявления взаимодействия опухоли и препаратов с организмом.

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

УПЖ – увеличение продолжительности жизни, СПЖ₀ и СПЖ_к – средняя продолжительность жизни в днях соответственно в опыте и контроле (мыши, не получавшие препараты – контроль роста опухоли). День прививки опухолевых клеток принят за 0.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерных программ. Достоверность различий выживаемости животных определяли по U-критерию Вилкоксона, различий средних величин – по t-критерию Стьюдента, а достоверность различий в долях выживших животных – по критерию χ^2 . За достоверные принимали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Биологическая активность биотерапевтической комбинации ЛИЗ+НН была оценена в двух опытах на разработанной нами ранее чувствительной модели [1; 4]. Особенностью модели является сочетание двух экспериментальных приемов для облегчения проявления испытываемыми препаратами противоопухолевой активности:

1. Использован феномен гибридной резистентности: лимфома EL4 мышей линии V6 привита гибридам V6D2F1 [7].
2. Проведена антисупрессорная обработка организма мышей, привитых опухолью, однократным введением ЦФ в относительно низкой дозе [5].

В проведенных экспериментах резистентность организма мышей оказалась неодинаковой, что, возможно, связано с различием в возрасте животных. В первом опыте были использованы мыши в возрасте около 2,5 мес со средней массой тела около 20 г (молодые мыши). Во втором опыте были использованы мыши в возрасте около 4 мес. со средней массой тела около 27 г (пожилые мыши).

Результаты первого опыта представлены в табл. 1 и на рис. 1. О противоопухолевой активности сравниваемых препаратов судили по торможению нарастания асцита и выживаемости. Влияние на накопление асцита оценено по параметру изменения массы тела к 18 суткам опыта.

В этом опыте были использованы интенсивно растущие животные – масса тела интактных мышей выросла к указанному сроку в среднем на 19 % по отношению к начальной массе тела. Масса же тела нелеченых мышей (КРО) выросла, за счет накопления асцита, значительно больше – на 28 %. Однократная обработка мышей ЦФ привела к торможению накопления асцита. Введение же мышам, обработанным ЦФ, НН, одного или в комбинации с ЛИЗ, приводило не только к отсрочке накопления асцита, но и ослаблению прироста массы тела. Сама обработка ЦФ привела к значительному увеличению продолжительности жизни подопытных мышей. Введение мышам, обработанным ЦФ, НН одного и особенно в комбинации с ЛИЗ приводило к еще большему увеличению выживаемости. Причем в случае использования комбинации ЦФ+ЛИЗ+НН у 2 мышей опухоли не развились. Однако в группах мышей, получивших один ЦФ или ЛИЗ после обработки мышей ЦФ, по одной мыши пало в результате развития летальной токсичности.

Результаты второго опыта представлены в табл. 2 и на рис. 2. В этом опыте нелеченные мыши проявили определенную резистентность к трансплантату: ТРО у мышей, не получавших препараты, был медленнее, чем в первом опыте, а прививаемость составила 92 %. Исследуемые препараты усилили резистентность мышей к трансплантируемой опухоли: у животных, получивших ЦФ, ЦФ+ЛИЗ и ЦФ+ЛИЗ+НН, опухоль не развилась у 45 %; 27 % и 83 % мышей, соответственно. Влияние на накопление асцита оценено по параметру изменения массы тела к 20 суткам опыта. В этом опыте были использованы пожилые животные – масса тела интактных мышей выросла в среднем на 6 % по отношению к начальной массе тела. Масса же тела нелеченых мышей (КРО) выросла за счет накопления асцита значительно больше, на 19 %, прежде всего за счет накопления асцита. В опытных группах наблюдалось достоверное ингибирование накопления асцита. Однако в группе мышей, получивших комбинацию ЦФ+ЛИЗ, у 3 мышей наблюдалось сильное похудание, одна из них пала в результате развития летальной токсичности. Таким образом, в обоих опытах комбинация вводимых длительно через рот ЛИЗ и НН значительно усилила резистентность получивших антисупрессорную обработку ЦФ мышей-гибридов V6D2F1 к трансплантатам опухоли EL4, происходящей от мышей родительской линии V6. Механизм этого эффекта требует специального изучения. Известно, что гибридная резистентность в примененной модельной системе определяется сочетанием врожденного и приобретенного иммунитета. Кроме того, ЦФ в использованном режиме наряду с опосредованным через иммунную систему действием проявляет и прямое угнетающее действие на опухоль. НН – известный модулятор реактивности организма [3]. Интересно отметить, что в последние годы пристально изучается биологическая активность низкомолекулярных двуспиральных интерферирующих РНК – специфических ингибиторов синтеза белков. В этой связи следует отметить, что в составе НН имеется близкая по свойствам фракция, проявляющая противоопухолевую активность [2].

Вывод

Обработка низкодозовым ЦФ в сочетании с длительным пероральным введением комбинации лизоцима белка куриных яиц с нуклеинатом натрия (натриевая соль низкомолекулярной РНК из пекарских дрожжей) сопровождается значительным увеличением резистентности мышей к опухолевым трансплантатам.

Таблица 1

Активность препаратов на молодых мышах с привитой опухолью

Группа	n	МТ ₀₋₁₈ , %	СПЖ, сут	Ранж, сут	УПЖ, %	Выл., %	ЛГ, %
ИК	10	119 ^u ±2	–	–	–	–	–
КРО	10	128±3	24,8	24–29	–	0	–
ЦФ	10	117 ^u ±3	37,1	24–45	50	100	10
ЦФ+НН	10	103 ^{ис} ±3	40,0	17–60	61	100	10
ЦФ+ЛИЗ+НН	10	101 ^{ис} ±1	41,0	30–740	65	80	0

Использованы самцы мышей-гибридов В6D2F1, 2,5-месячного возраста. Опухоль прививали введением по 5×10^4 асцитных клеток EL4 в/бр в д. 0. Начало лечения – д. 3; окончание – д. 41. ЦФ – 100 мг/кг, в/бр, в д. 3, однократно. ЛИЗ и НН – через рот. Разовые дозы: ЛИЗ – 100 мг/кг; НН – 125 мг/кг. n – количество мышей; СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни мышей с привившейся опухолью; Выл. – «вылеченные» мыши, у которых лимфома не развилась к 90 суткам опыта; ЛГ – лекарственная гибель; ИК – интактный контроль; КРО – контроль роста опухоли; i, u, c – достоверное отличие от групп ИК, КРО и ЦФ, соответственно.

Таблица 2

Активность препаратов на пожилых мышах с привитой опухолью

Группа	n	МТ ₀₋₂₀ , %	СПЖ, сут	Ранж, сут	УПЖ, %	Выл., %	ЛГ, %
ИК	10	106 ^u ±1	–	–	–	–	–
КРО	13	119±3	31,7	25–52	–	8	–
ЦФ	11	101 ^u ±1	44,2	33–63	39	45	0
ЦФ+ЛИЗ	11	95 ^u ±5	38,0	33–43	20	27	9
ЦФ+ЛИЗ+НН	12	100 ^u ±1	52,0	50,54	64	83	0

В опыте использованы 4-месячные самцы мышей В6D2F1. Начало лечения – день 4, окончание – день 43. Забой выживших животных на день 111. Остальное смотри в примечаниях к табл. 1.

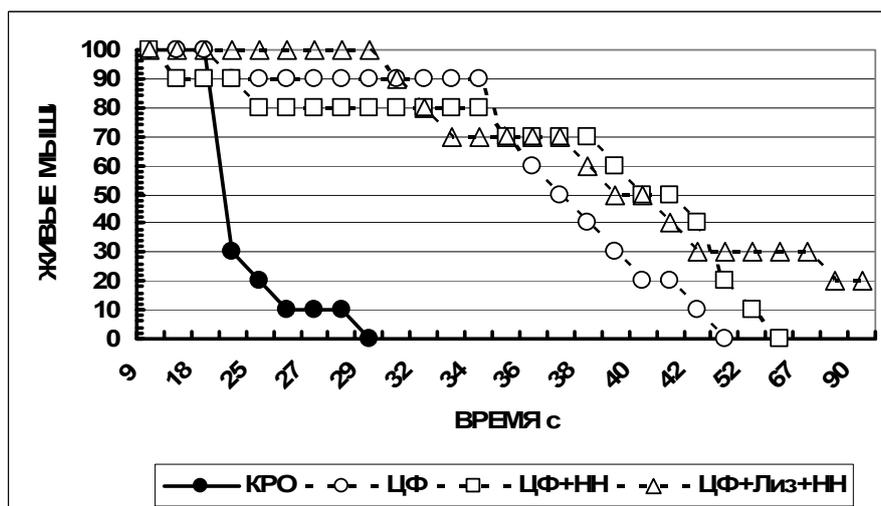


Рис. 1. Активность препаратов на молодых мышях с привитой опухолью.

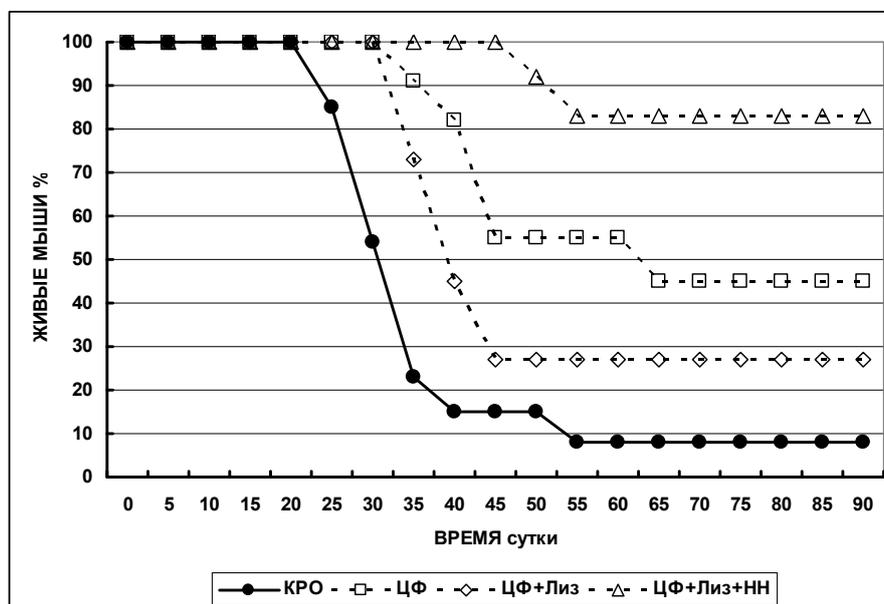


Рис. 2. Активность препаратов на пожилых мышях с привитой опухолью.

Литература

1. Бархоткина М.Ф., Пименов А.А., Черткова А.И. и др. Развитие противоопухолевой резистентности и Т-клеток иммунологической памяти при химиотерапии Т-клеточного лейкоза мышей // Иммунология. – 1985. – №2. – С. 30–4.
2. Захарян Р.А., Месропян Н.П., Мовсесян А.В. и др. Противоопухолевая активность Са-двуспиральной РНК из нуклеината натрия // Эксп. Онкол. – 1985. – Т. 7, № 3. – С. 54–6.
3. Земсков А.М., Земсков В.М., Передерий В.Г.: Модулирующая функция дрожжевой РНК // ЖМЭИ. – 1982. – № 9. – С. 9–13.
4. Черткова А.И., Бухман В.М., Сыркин А.Б. Потенцирование бластолизинем противоопухолевого эффекта циклофосфана при Т-клеточном лейкозе мышей // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 1984. – Т. 98, № 7. – С. 57–9.
5. Ven-Efrain S. Immunomodulating anticancer alkylating drugs: Targets and mechanisms of activity // Current Drug Targets. – 2001. – 2. – P. 197–212.
6. Gorer P.A. Antibody response to tumor inoculation in mice with special reference to partial antibodies // Cancer Res. – 1947. – 7(10). – P. 634–41.
7. Kumar V., Luevano E., Bennett M. Hybrid resistance to EL-4 lymphoma cells. I. Characterization of natural killer cells that lyse el-4 cells and their distinction from marrow-dependent natural killer cells // J. Exp. Med. – 1979. – 150. – P. 531–47.

УДК 616-006.446.8-092.4:616-091.818:616.155.34:576.385.5

Н.И. Гринева, Т.В. Ахлынина, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Д.А. Шмаров, Т.Г. Сарычева, Т.В. Боровкова, Н.М. Найденова, Г.П. Саркисян, А.М. Тимофеев, Л.Ю. Колосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, А.Г. Туркина

РАЗЛИЧИЯ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ Ph⁺ КЛЕТОК ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ХМЛ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ: ТРИ ТИПА Ph⁺ КЛЕТОК ПРИ ХМЛ.

Ph⁺ КЛЕТКИ С ВЫСОКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ПРОЛИФЕРАЦИИ

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Контактная информация:

Гринева Нина Ивановна, д-р хим. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории генной инженерии

адрес: 125167, Москва, Новозыковский проезд, д. 4а; тел. +7(499)-615-31-02

e-mail: nigrin27@mail.ru

Статья поступила 19.06.2009, принята к печати 20.10.2009.

Резюме

Разработан кинетический подход к детальному исследованию индивидуальных особенностей пролиферации и дифференцировки Ph⁺ клеток в культуре. С помощью анализа скоростей пролиферации и дифференцировки Ph⁺ клеток в суспензионной культуре обнаружены три типа Ph⁺ клеток от разных больных ХМЛ с различиями в пролиферации и дифференцировке (созревании), заключающиеся в разных скоростях накопления пролиферирующих незрелых Ph⁺ клеток, P; клеток, созревающих без деления, D. Соотношения скоростей накопления клеток P и D отражают эффективность пролиферации и дифференцировки Ph⁺ клеток. Эффективность и скорость пролиферации наибольшая у Ph⁺ клеток 1 типа (P/D > 1), а у Ph⁺ клеток 2 типа при скорости созревания большей, чем скорость пролиферации, эффективность пролиферации наоборот наименьшая (P/D ≤ 1). По длительности эти условия (~7 суток) сопоставимы с циклом дифференцировки гемопоэтических клеток. Для Ph⁺ клеток 3 типа за тот же период времени происходит неоднократное чередование преимущества пролиферации (накопления клеток P) и созревания (накопления клеток D). Пролiferация и дифференцировка Ph⁺ клеток 1 типа изучена детально. Эти Ph⁺ клетки выделены из костного мозга или периферической крови больных ХМЛ в фазе акселерации, при бластном кризе, в хронической фазе с активной прогрессией и составляют пятую часть исследованных Ph⁺ клеток. Ph⁺ клетки 1 типа пролиферируют с повышенной эффективностью – индексом P/D > 1-2 ÷ 20 и долей Ph⁺ клеток в фазах S+G₂/M клеточного цикла ≥ 20-45%. Пролiferация и дифференцировка Ph⁺ клеток 1 типа приводит к повышенному образованию миелоцитов, промиелоцитов и/или бластов при низком содержании нейтрофилов, созревающих без деления. Чем ниже содержание нейтрофилов, созревающих без деления, и чем выше их апоптоз, тем выше эффективность пролиферации, тем серьезнее прогрессия ХМЛ, из ПК и КМ которых выделены Ph⁺ клетки.

Ключевые слова: культивирование гемопоэтических Ph⁺ клеток, хронический миелолейкоз, Филадельфийская хромосома, апоптоз *in vitro*, эффективность пролиферации и дифференцировки Ph⁺ клеток.

N.I. Grineva, T.V. Akhynina, L.P. Gerasimova, T.E. Manakova, D.A. Schmarov, N.G. Sarycheva, T.V. Borovkova, N.M. Naydenova, G.P. Sarkisyan, A.M. Tumofeev, L.Yu. Kolosova, T.I. Kolosheynova, L.G. Kovaleva, A.G. Turkina

THE ALTERATION IN PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION

OF Ph⁺ CELLS DERIVED FROM PATIENTS WITH CML:

THREE TYPES OF CML Ph⁺ CELLS.

Ph⁺ CELLS WITH HIGH PROLIFERATIVE EFFICIENCY.

Hematology Research Center of RAMS, Moscow

Abstract

We have developed the new approach to investigate the individual peculiarities of Ph⁺ cell proliferation and differentiation in the culture derived from patients with CML at different CML phases. Three types of CML Ph⁺ cells have been detected based on the studying of cell proliferation and differentiation rates: P cells; CML Ph⁺ cells accumulated as a result of proliferation of non-maturated cells; D cells, CML Ph⁺ cells matured without dividing. Index P/D, reflects the efficiency of cell differentiation with and without cell proliferation. The type 1 cells were characterized by high P/D (> 1); the type 2 cells were characterized by lower P/D (≤1) at the same time we observed that these cells maturation are speeded parallel with the reducing of cell proliferation rate. Proliferation and differentiation period of time both of 1 and 2 Ph⁺ cells types, ~ 7 days, is comparable with the differentiation cycle of hematopoietic cells. The type 3 cells were characterized by repeated interchanges in cell proliferation (P) and differentiation (D). Proliferation and differentiation of type 1 Ph⁺ cells were studied in detail. These cells were isolated from the bone marrow of CML patients or from the peripheral blood at the acceleration phase, blast crisis or chronic phase. These Ph⁺ cells account to fifth part of cells analysed. We have postulated that the type 1 Ph⁺ cells proliferate with P/D > 1-2 ÷ 20, the number of cells at the S+G₂/M phases of cell cycle was ≥ 20-45 %. Here, we show that proliferation and differentiation of type 1 Ph⁺ cells lead to accumulation of myelocytes, promyelocytes or/and blasts against the background of the low content of neutrophils that were matured without dividing. Based on the obtained data we conclude, if the accumulation of neutrophils, maturing without dividing is reduced parallel with the increasing of their apoptotic index the significant progression in CML patients is observed.

Key words: cultivation of hematopoietic Ph⁺ leukocytes, chronic myeloid leukemia, Ph⁺ chromosoma, cell proliferation and differentiation in culture, apoptosis *in vitro*, Ph⁺ cells *in culture*, Ph⁺ cell distribution in the cell cycle phases.

Введение

Хронический миелолейкоз является миело-пролиферативным заболеванием, связанным с хромосомной транслокацией t(9;22)(q34;q11) в гемопоэтической полипотентной стволовой клетке и образованием Филадельфийской хромосомы с онкогеном *bcr/abl* [25; 28; 40]. Ph⁺клетки содержат онкоген *bcr/abl* и его онкобелок – тирозинкиназу p210 и участвуют в патогенезе ХМЛ. При прогрессии ХМЛ из хронической фазы в фазу акселерации и бластный криз моноклональное заболевание переходит в поликлональное с дополнительными хромосомными аномалиями или без таковых [1; 7]. По диагностике и отношению к терапии у разных больных наблюдаются различия в течении ХМЛ.

Современные представления о роли хромосомных транслокаций, онкогена *bcr/abl* и его мутаций в клеточных и молекулярных механизмах широко и весьма успешно исследованы на примере многочисленных клеточных линий и лейкозов [25; 27–29; 36–39; 43]. Клеточные механизмы патогенеза ХМЛ также подробно изучались, но многое остается неясным [17–20; 27–29; 37–43].

Давно известно свойство клеток костного мозга и периферической крови ХМЛ пролиферировать в суспензионных культурах. По увеличению клеточности и включению ³H-тимидина по мере культивирования обнаружено усиление пролиферации незрелых клеток вначале, а затем ее уменьшение до уровня пролиферации при гемопоэзе в норме. Обнаружена зависимость активности пролиферации от стадий ХМЛ. Отмечено, что активность пролиферации при БК ХМЛ уменьшается [21–23; 30; 31; 33–35; 45; 47]. При ХМЛ гемопоэтических пролиферирующих незрелых клеток образуется меньше, а нейтрофилов, созревающих без деления, наоборот больше, чем в норме [21; 58; 59]. Стволовые Ph⁺клетки пролиферируют менее активно, чем стволовые клетки доноров, а более зрелые Ph⁺клетки накапливаются наоборот более активно [20; 57; 58]. На этом основании в ряде работ предполагается, что причиной ХМЛ служит дисбаланс самоподдержания (*self-renewal*) стволовых клеток и пролиферации миелоидных клеток-предшественников с созреванием их поздних потомков, а не пролиферация Ph⁺клеток под действием тирозинкиназы p210 ^{bcr/abl} [21; 56–59], как это принято в настоящее время.

Очевидно, что не все особенности клеточной и молекулярной регуляции Ph⁺клеток при ХМЛ ясны, хотя способность онкогена *bcr/abl* и тирозинкиназы p210 определять опухолевые свойства, повышать жизнеспособность, активировать пролиферацию и блокировать апоптоз в линиях Ph⁺клеток детально изучалась [16–18; 25; 29; 41; 43; 49; 50].

Для культур первичных Ph⁺клеток от больных ХМЛ соотношения активации пролиферации и ингибирования апоптоза более сложные, чем для клеточных линий. С одной стороны экспрессия *bcr/abl* и p210 необходимы для обеих функций и реализуют их одновременно. С другой стороны первая активность ведет к апоптозу, если она не сбалансирована антиапоптотическими сигналами. Несогласованность данных объясняют тонкими различиями в регуляции клеточных линий и первичных Ph⁺клеток [22; 23; 27; 54; 57].

В работе [25] исследована роль разных мутантов p210 в клеточной пролиферации, опухолевости и апоптозе Ph⁺клеток, полученных трансфекцией генно-инженерными конструктами с различными мутациями в онкогене *bcr/abl*.

Показано, что функции p210 – активации пролиферации и ингибирования апоптоза проявляются отдельно и обязаны разным мутациям в *bcr/abl*, в том числе – отвечающим за разные изменения путей сигнальной трансдукции [28; 31; 52]. Оказалось, что изменения в соотношении активации пролиферации и блокирования апоптоза может смещать их баланс в разных направлениях и в разной степени в зависимости от мутаций в онкогене *bcr/abl*.

Для Ph⁺клеток от больных ХМЛ такие свойства не изучены по причине отсутствия удобных моделей и подходов, хотя мутации в *bcr/abl* активно исследуются и используются для диагностики и выбора терапии ХМЛ гливеком и его аналогами [16; 19; 20; 29; 49–51; 55].

Целью данной работы является изучение клеточных и молекулярных механизмов пролиферации и дифференцировки индивидуальных Ph⁺клеток многих больных ХМЛ в культуре. В поисках подходов к оценке особенностей Ph⁺клеток от ХМЛ в качестве одной из задач исследовалась кинетика ПД в суспензионной культуре Ph⁺клеток – мононуклеаров, выделенных из ПК и КМ от 23 больных ХМЛ до начала лечения, а также при ХФ, ФА и БК ХМЛ. Для этого использована разработанная ранее методика исследования ПД образца Ph⁺клеток [3; 9], где показано, что ПД Ph⁺клеток ХМЛ в культуре протекает аналогично схеме усиленного миелопоэза ХМЛ *in vivo* и что с помощью кинетики можно определить эффективность ПД, влияющие ростовых факторов, экспрессию ряда дифференцировочных антигенов и *bcr/abl*. В данной работе также изучалась кинетика апоптоза и распределения Ph⁺клеток в фазах клеточного цикла в сравнении с характером их ПД.

Материалы и методы

Использованы материалы: гепарин (Flow, Англия); Limphorger, среда альфа-МЕМ (MP Biomedical, США); DEPC, Hepes, Трис, PBS, эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС), 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); PBS (10мМ фосфатный буфер + 0,13 М NaCl + 2,7 мМ KCl, pH 7,4) таблетированный, НПЦ «Эко-сервис», Россия.

Исследовали Ph⁺мононуклеары, выделенные из ПК и КМ от больных ХМЛ в ХФ до лечения и в процессе лечения в ХФ, ФА и БК ХМЛ. Характеристики Ph⁺клеток и больных ХМЛ, из ПК и КМ которых получены мононуклеары, даны в табл. 1–3. При ХМЛ в мононуклеарах содержится ~ 90 % клеток миелоидного роста: гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов (лейкоцитов), также и некоторое количество клеток-предшественников всех ростков кроветворения (бластов). По определению при ХМЛ продукция миелоидных Ph⁺клеток превалирует [1; 7]. В качестве Ph⁺мононуклеаров в основном фактически представлены Ph⁺лейкоциты (~ 95 %) и в их составе гранулоциты (70–90%). Именно их ПД анализировали в данной работе. В Ph⁺клетках определены типы мРНК *bcr/abl*: b3a2, b2a2 или e1a2 с помощью метода RT-PCR как указано в источниках [3; 8].

Ph⁺мононуклеары из ПК и КМ получали, отбирая 10–15 мл крови из вены или 1–2 мл КМ из заднего гребешка подвздошной кости больного на разных стадиях ХМЛ, во флакон с гепарином (50 ед/мл), насливали на лимфопреп или фиколл с плотностью 1,077 или 1,119 г/см³ в отдельных случаях (табл. 4).

Фракцию Ph⁺ клеток выделяли центрифугированием 30 мин при 1500 об/мин и отбирали легкую фракцию. Выделенные клетки дважды промывали буфером PBS, pH 6,8, затем α -MEM средой.

Ph⁺ клетки суспендировали в α -MEM среде и получали фракцию Ph⁺ лейкоцитов, содержащих клетки-предшественники (бласты), лимфоциты, гранулоциты и моноциты, а также некоторое количество созревающих нейтрофилов. Гранулоциты и часть зрелых нейтрофилов при ХМЛ имеют низкую плавающую плотность и в отличие от нормальных нейтрофилов полностью не отделяются от мононуклеаров в градиенте плотности 1, 077 лимфопрена и фиколла. Полученные Ph⁺ клетки исследовали при культивировании в суспензионной культуре.

Содержание живых и мертвых клеток анализировали трижды на мазках, окрашенных 0,2% трипановым синим по Романовскому с подсчетом клеток в камере Горяева.

Культивирование Ph⁺ клеток проводили аналогично [3]. $2 \div 8 \times 10^6$ клеток/мл культивировали в суспензии с α -MEM средой, содержащей 20 % эмбриональной телячьей сыворотки ЭТС, 2 мМ L-глутамина, 10^4 М 2-меркаптоэтанола, 100 ед/мл пенициллина и 50 ед/мл стрептомицина, 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,2–7,4 в 25 см² пластиковом матрасе 2–3 ч, затем неадгезированные клетки центрифугировали 7 мин при 1 500 об/мин разбавляли до концентрации $0,8 \div 1,4 \times 10^6$ клеток/мл той же средой, переносили в 24-ячеечные или 96-ячеечные платы по 12 ячеек на каждую пробу и инкубировали при 37 °С в условиях абсолютной влажности и 5 % содержания CO₂ в течение 2 ч без ЭТС. Затем добавляли ЭТС до 10–20 %, и клетки культивировали 6–14 суток, отбирая пробы целыми ячейками.

Каждая точка выполнялась трижды. В отдельных случаях Ph⁺ лейкоциты культивировали после 2-часовой синхронизации Ph⁺ клеток в отсутствии ЭТС. Для этого Ph⁺ клетки отмывали от ЭТС центрифугированием в суспензии в среде α -MEM, выдерживали и через 2 ч добавляли ЭТС и далее культивировали, как указано выше.

В отбираемых пробах анализировали число живых и погибших клеток, морфологический состав клеток на мазках в трех зонах по 100 клеток в каждой по методу Романовского и идентифицировали морфологию клеток по Абрамову [2] и определяли содержание каждого вида клеток в пробе. По содержанию клеток вычисляли концентрацию каждого вида клеток в пробах в расчете на 10^6 клеток/мл. Кинетические кривые накопления и расходования субпопуляций Ph⁺ лейкоцитов, гранулоцитов, а также суммы пролиферирующих клеток, P (бластов, промиелоцитов и миелоцитов) и суммы нейтрофилов, созревающих без деления, клеток D – метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов строили на основании изменения концентраций этих клеток. Кривые отражали скорость образования одного вида дифференцирующихся клеток (накопления) с последовательным или параллельным его превращением (расходованием) в следующую субпопуляцию, известную для данной дифференцировки, что ведет к падению скорости накопления клеток, т.е.к их расходование.

Средняя ошибка определения $\pm 5 \div 11$ %. В пробах также анализировали апоптоз и распределение клеток по фазам клеточного цикла с помощью цитофлуориметрии.

Ph⁺ хромосому в клетках ПК и КМ от больных идентифицировали в лаборатории кариологии ГНЦ РАМН цитогенетическим методом для 100 % митозов или методом FISH.

В Ph⁺ клетках от каждого больного идентифицировали типы мРНК *bcr/abl*: b3a2, b2a2 или e1a2 методом RT-PCR как указано в статьях [3; 8].

Цитофлуориметрический анализ кинетических кривых апоптоза и распределения Ph⁺ клеток в фазах клеточного цикла при культивировании Ph⁺ клеток. Пробы Ph⁺ клеток (по 5 000) после выделения из КМ и ПК в градиенте плотности и пробы, отобранные в процессе культивирования, центрифугировали 7 мин при 2 000 об/мин и 4 °С, промывали буфером PBS и по каплям фиксировали охлажденным 70%-ным этанолом в течение 30 мин при 4 °С. Перед измерением полученную взвесь промывали PBS, центрифугировали и осадок инкубировали в 0,5 мл PBS, содержащего 5 мкг/мл пропидий йодида и 50 мкг/мл рибонуклеазы А, в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте [13; 15]. Измерения проводили в проточном флуориметре EPICS-XL. Клетки гранулоцитарного гейта анализировали с помощью прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния и одновременно регистрировали флуоресценцию FL2 пика по амплитуде и площади импульса (это позволяло отсекал слившиеся клетки, конгломераты и обрывки клеток) в линейном и логарифмическом масштабе, определяя клетки в апоптозе. К клеткам, вышедшим в апоптоз, относили FL2-Н частицы с гиподиплоидным набором ДНК, располагающиеся в виде пика влево от пика клеток с диплоидным набором ДНК (уменьшение размера клеток не более 2 порядков). Долю гранулоцитов, находящихся в апоптозе, определяли для клеток, анализируемых в гранулоцитарном гейте, где отсутствуют обрывки клеток. В тех же пробах Ph⁺ клеток получали ДНК-гистограммы и в них анализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла (S, G₂/M, G₁/0), проверяя отсутствие пика С8, указывающего на тетраплоидные клетки. Для анализа ДНК-гистограмм использована разработанная нами ранее специальная программа компьютерной обработки данных. В основу был положен алгоритм, разработанный для асинхронных пролиферирующих клеточных популяций (SFIT-метод) [26].

Кинетические кривые пролиферации и гибели Ph⁺ лейкоцитов, которые при ХМЛ составляют основу мононуклеаров, получали согласно концентрации живых и мертвых клеток, которую и вычисляли по доле клеток, определяемой как указано выше, и отнесенных к 10^6 клеток/мл. О скорости пролиферации лейкоцитов и гранулоцитов судили по кинетическим кривым их накопления и расходования во времени. Получали кинетические кривые, означающие, что параллельно образованию (накоплению) клеток соответствующей морфологии протекает превращение их в следующие субпопуляции (расходование СЯ нейтрофилов указывает на их гибель).

Кинетические кривые дифференцировки Ph⁺ лейкоцитов и их субпопуляций:

- миелоидных клеток,
- лимфоцитов,
- гранулоцитов
- бластов,
- промиелоцитов,
- миелоцитов,
- метамиелоцитов,
- ПЯ сегментоядерных нейтрофилов.

Строили вычисляя концентрацию соответствующих клеток в пробах умножением их доли, определяемой по морфологии на мазках, в пересчете на 10^6 клеток/мл.

Морфологию на мазках определяли, как указано выше.

Состав клеток на мазках анализировали в трех зонах по 100 клеток в каждой зоне. Ошибка определения $\pm 5 \div 11\%$.

Отметим, что кроме морфологии Ph^+ клетки от ХМЛ № 1.1 и № 2.6 идентифицировали по экспрессии антигенов CD с набором моноклональных антител как указано в работе [9], где и приведены результаты идентификации и кинетики экспрессии антигенов. Результаты согласуются с данными, полученными при анализе морфологии клеток по содержанию и кинетике.

Кинетические кривые индексов эффективности P/D при культивировании определяли как изменение соотношения скоростей накопления и расходования суммы пролиферирующих клеток, P [незрелые] (бласты, промиелоциты, миелоциты), и суммы нейтрофилов, созревающих без деления, D [условно зрелые], эквивалентное соотношению концентрации клеток P и D на том основании, что

$$\frac{V_p}{V_d} = \frac{K_p [P] t}{K_d [D] t} = \frac{K_p}{K_d} \times \frac{[P]}{[D]}, \text{ где}$$

V_p и V_d – скорости накопления клеток P и D , K_p и K_d константы скоростей, $[P]$ и $[D]$ концентрации клеток; $K_p/K_d = K$ – константа удельной эффективности ПД.

Результаты и обсуждение

Первой задачей данной работы являлось изучение различий в пролиферации и дифференцировке в культуре гемопоэтических Ph^+ клеток – мононуклеаров, выделенных от больных ХМЛ в разных фазах и, предположительно различающихся элементами структуры и функций *bcr/abl* онкогена, его мРНК и тирозинкиназой p210. Для этого были получены кинетические кривые ПД 37 образцов Ph^+ клеток, выделенных из КМ и ПК 23 больных в разных фазах ХМЛ при культивировании в одинаковых условиях. Ph^+ мононуклеары при ХМЛ содержат клетки-предшественники всех ростков кроветворения: миелоидные клетки, лимфоциты и примесь созревающих нейтрофилов, содержание которых изменяется при культивировании. При ПД в качестве Ph^+ клеток в составе мононуклеаров анализировали Ph^+ лейкоциты и Ph^+ гранулоциты, которые составляют основное содержание Ph^+ клеток ХМЛ. Характеристика Ph^+ клеток, рассматриваемых в данном сообщении, и их источников – больных ХМЛ дана в табл. 1–3.

В пробах клеток по ходу культивирования определены кинетические кривые пролиферации Ph^+ лейкоцитов и их гибели в культуре, дифференцировки субпопуляций Ph^+ лейкоцитов (миелоидных клеток, гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов) и субпопуляций Ph^+ гранулоцитов (бластов, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и СЯ нейтрофилов).

Полученные кривые представляли зависимости скорости образования и превращения каждого вида клеток одних субпопуляций в следующие субпопуляции при дальнейшей ПД. Характер кривых указывает на скорость образования (накопления) данного вида клеток и их последовательно-параллельные превращения (расходование) в следующий вид – субпопуляцию или гибель клеток, что характерно для ПД. Рассматривались скорости дифференцировки отдельных субпопуляций и суммы клеток, дифференцирующихся одновременно с делением, отвечающих за пролиферацию, и отдельно суммы клеток, созревающих (дифференцирующихся) без деления, характеризующих созревание.

Типы Ph^+ клеток от больных ХМЛ

Как известно, при миелопоэзе вначале пролиферируют с одновременной дифференцировкой незрелые гемопоэтические клетки-предшественники (и Ph^+ клетки в частности). Затем без деления созревают нейтрофилы [14]. Таким образом, кинетические кривые ПД суммы пролиферирующих, – незрелых Ph^+ клеток P (миелоидные клетки-предшественники, бласты, промиелоциты и миелоциты), и гранулоцитов, созревающих без деления, D (ММ, ПЯ и СЯ нейтрофилы, условно зрелые), отражают два ключевых этапа ПД: генетической регуляции ПД при пролиферации с дифференцировкой и созревании (дифференцировке) без деления клеток. Из табл. 1–3 и рис. 1–4 видно, что кинетические кривые клеток P и D от разных ХМЛ заметно отличаются либо большей скоростью пролиферации, т.е. накопления клеток P (и, следовательно, их концентраций) по сравнению со скоростью созревания клеток D .

- 1 тип: $[nз] > [з]$, либо наоборот большей скоростью созревания, т.е. накопления клеток D по сравнению со скоростью пролиферации
- (2 тип: $[з] > [nз]$).

Это означает, что скорость пролиферации больше скорости созревания у Ph^+ клеток 1 типа, и наоборот скорость созревания выше скорости пролиферации у Ph^+ клеток 2 типа. По длительности ПД Ph^+ клеток 1 и 2 типа (без изменения преимущества скоростей пролиферации или созревания) сопоставимы с циклом дифференцировки функционирующего клона гемопоэтических клеток ~ 7 сут [10; 11; 45].

В 3-й группе клеток за тот же период времени наблюдается неоднократное чередование этапов то с преимуществом скорости пролиферации, то этапа созревания с преимуществом уже скорости созревания над пролиферацией (3 тип). При этом чередование их скоростей, естественно, сопровождается чередованием концентраций клеток $P > D$ с $D > P$, что видно по пересечению кривых накопления клеток P и D , которые приводятся в последующих публикациях. Соотношение скоростей двух процессов обычно соответствует их эффективности относительно друг друга и в данном случае индексу эффективности P/D . Отсюда различия в Ph^+ клетках от индивидуальных больных ХМЛ связаны с различиями в относительных скоростях их пролиферации и созревания и, следовательно, с различиями в регуляции их ПД. Для ПД разных типов Ph^+ клеток соответственно изменяется соотношение скоростей пролиферации и созревания – эффективность ПД и величина индексов эффективности $P/D \geq 1$, $P/D \leq 1$ и при P/D^2 – чередование $P/D \geq 1$ с $P/D \leq 1$ и так далее. Отношение содержания P и D клеток в отдельных пробах ПК и КМ гемопоэтических клеток ранее известно как индекс созревания [7]. По результатам исследования ПД в суспензионной культуре Ph^+ клеток 34 образцов из ПК и КМ от 23 больных ХМЛ (см. табл. 1–3) этим данным отвечают три типа Ph^+ клеток. Пятая часть изученных в этом сообщении Ph^+ клеток (от разных больных ХМЛ в разных фазах болезни) относится к 1 типу, четверть Ph^+ клеток составляет 2 тип и немногим более половины – 3 тип с чередованием пролиферации и созревания. Кинетика ПД трех типов Ph^+ клеток была исследована в деталях и сопоставлена с распределением Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла, характеристикой апоптоза и транскрипции *bcr/abl* гена. Кинетические кривые скоростей накопления и расходования Ph^+ клеток от разных больных ХМЛ здесь и в следующих статьях выявляют общие черты и различия в ПД клеток при ХМЛ, известные и неочевидные. Здесь обсуждаются результаты исследования Ph^+ клеток 1 типа с высокой эффективностью пролиферации.

Ph⁺клетки 1 типа с высокой эффективностью пролиферации

ПД Ph^+ клеток 1 типа происходит при повышенной эффективности P/D и при длительном преимуществе пролиферации Ph^+ клеток над дифференцировкой Ph^+ клеток, созревающих без деления. Из рис. 1–4, табл. 1 и 4 видно, что ПД Ph^+ клетки 1-го типа культивируются в течение ~6–14 сут и эффективность их пролиферации составляет $P/D^{1-2} > 1-2 \div 20$. Пятая часть изученных в этом сообщении Ph^+ клеток (от разных больных ХМЛ в разных фазах болезни, табл. 1) пролиферирует и дифференцируется в условиях 1 типа ПД с превышением скорости и концентрации пролиферирующих клеток над клетками, дифференцирующимися без деления: при $[нз] > [з]$.

К общим чертам ПД Ph^+ моноклеаров из ПК и КМ разных больных ХМЛ, обнаруженных в данной работе, относится в первую очередь способность Ph^+ клеток пролиферировать и дифференцироваться в одних и тех же условиях суспензионной культуры с прохождением одного–двух циклов ПД в соответствии с ПД гемопоэтических клеток [1; 7; 14; 45]. Ph^+ клетки в среде с ЭТС в отсутствии факторов и цитокинов, будучи изолированными от регуляции клеточного окружения *in vivo*, пролиферировали и дифференцировались по известной для ХМЛ *in vivo* схеме со значительно усиленным миелопоэзом и накоплением миелоидных клеток, что мы ранее наблюдали на примере ПД Ph^+ клеток одного больного ХМЛ [3]. Это свойство Ph^+ клеток трех типов, вероятно, определяется наследованием и воспроизведением в культуре функций генетических элементов исходных клеток от больных ХМЛ с особенностями их регуляции онкогеном *bcr/abl* и p210 тирозинкиназой.

Кинетические кривые ПД Ph^+ лейкоцитов 1 типа в культуре и их субпопуляций, как и Ph^+ клетки 2 и 3 типа, показывают общий характер образования (накопления) и последующего превращения (расходования) клеток на следующих этапах ПД. Видно, что пролиферация Ph^+ лейкоцитов от ХФ и ФА ХМЛ протекает с образованием максимума пролиферации Ph^+ лейкоцитов на 1–4 сут. Их концентрация возрастает в 1,2–4 раза и затем понижается в течение следующих 4–7 сут. Далее на 6–9 сут. кривые роста проходят некоторый минимум (иногда виден только перегиб), затем концентрация клеток возрастает (вторая активация пролиферации) и снова падает (табл. 1 и рисунки). Один цикл ПД в культуре занимает ~7 сут., о чем можно судить по времени между первой и второй активацией (ускорением) пролиферации клеток (рис. 1–3; 5). Первая активация пролиферации наблюдается на 1–3 сут.; вторая активация наступает после значительной гибели закончивших дифференцировку Ph^+ клеток на ~6–8 сут. и уменьшения концентрации всех Ph^+ клеток на порядок (рис. 1–4) и более [3; 9]. Интервал между 1 и 2 активациями ПД совпадает со временем жизни популяции гранулоцитов в норме [10; 11; 14; 45]. Исключение составляют клетки от больного БК ХМЛ (табл. 4). Их рост в культуре практически не активируется; скорость их пролиферации и концентрация клеток только уменьшается. Даже небольшое накопление зрелых (как результат ПД или как примесь в исходных моноклеарах, выделенных на фиколле 1,077 или 1,119) уменьшает гибель клеток и индекс P/D. Из табл. 1, 4 и рис. 1–4 видно, что значения P/D Ph^+ клеток разных больных варьируют от 1–2 до 4 или от 4 до 20, а через 6 сут. культивирования P/D не превышает 1–2 и 1–4 соответственно. Исключение составляют Ph^+ лейкоциты при БК ХМЛ. На 1–4 сут. культивирования индекс P/D заметно падает: до 0,8–2,5 или 1–6 соответственно (табл. 1, 4; рис 1–2; 4).

Скорость достижения максимальной концентрации Ph^+ клеток от разных ХМЛ варьирует от 1 до 7 сут. Для Ph^+ клеток № 1.2, 1.3 и 1.5 максимумы накопления Ph^+ клеток по времени совпадают с максимальной эффективностью – индексом P/D (табл. 1). Эти результаты согласуются с исследованиями кинетики пролиферации лейкоцитов от больных в культуре и с клиническими данными об изменении лейкоцитоза при переходе от ХФ к ФА и БК ХМЛ [19–23; 33–35; 45; 47].

Распределение Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла и доля апоптоза в характеристике пролиферации. Кроме кинетики ПД также исследовали кинетику распределения клеток по фазам клеточного цикла и апоптоза, определяемого цитофлуориметрически с пропидий йодидом, а также гибели клеток, анализируемой по окрашиванию трипановым синим (рис. 1–4). Отметим, что апоптоз из-за быстрой гибели клеток, выходящих в апоптоз (~6–12 ч), выявляет гибель клеток на момент определения. С трипановым синим видно накопление погибших клеток за 3–5 сут. На рис. 2 видно, что активный апоптоз (рис. 2) и общая гибель клеток (рис. 1–4) способствуют 1 типу ПД, повышая индекс эффективности P/D.

При ПД Ph^+ клеток из ПК ХМЛ № 1.2, имеющих невысокие значения P/D (1,2–1,8), доля Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла S + G₂/M (клетки пролиферирующего пула) увеличивается с 20 до 45% с максимумом на 3 сут. (рис. 2б) и падает к 6 сут. При этом наблюдается апоптоз нейтрофилов, созревающих без деления и накапливающихся на 3–5 сут. Высокие значения P/D характерны для Ph^+ клеток от ХМЛ в фазе акселерации или БК № 1.3 и 1.4 (рис. 3; табл. 4) и ХФ ХМЛ, довольно быстро достигающей БК (ХМЛ № 1.1, рис. 1 и табл. 1). Индекс P/D при первой активации пролиферации Ph^+ клеток № 1.1 на 1 сут. достигает 12 (рис. 1).

Максимумы пролиферации соответствуют максимальной доле их пролиферирующего пула в S+G₂/M фазах клеточного цикла и максимальной эффективности P/D. Они также зависят от скорости накопления и гибели зрелых Ph^+ клеток. При этом кинетические кривые накопления Ph^+ лейкоцитов и распределения Ph^+ клеток по фазам клеточного цикла хорошо согласуются по характеру и скорости достижения максимумов (рис. 2а–б). Одинаковое увеличение в 3 раза пула пролиферирующих Ph^+ клеток в фазах S+G₂/M и накопления Ph^+ лейкоцитов свидетельствует об активной пролиферации в 1 цикле дифференцировки. Та же активность пролиферации видна на кривой роста числа Ph^+ лейкоцитов. Максимум P/D = 12 для клеток № 1.1 наблюдается на 1 сут. культивирования, а максимальное накопление Ph^+ миелоцитов, которые составляют здесь основное содержание Ph^+ клеток, достигается на 3–7 сут. (рис. 1).

Максимальные значения P/D Ph^+ клеток от БК ХМЛ № 1.4 достигает 20 при практическом отсутствии нейтрофилов, созревающих без деления (табл. 4). Увеличение P/D (от 1–3 до 9–13 за 7 сут.) соответствует завершению ПД Ph^+ клеток от больного ФА ХМЛ № 1.3 (рис. 3). К концу 1–2 циклов дифференцировки гибель и апоптоз клеток увеличивается от 5 до 60%. На рис. 2 б видно повышение доли клеток в S+G₂/M фазах клеточного цикла и доли апоптоза. При этом максимум накопления СЯ понижается на 3 и 4 сут. Повышение доли клеток в S+G₂/M фазах по скорости соответствует накоплению Ph^+ лейкоцитов и их компонентов на кинетических кривых ПД Ph^+ лейкоцитов как и повышению индексов P/D. Это означает, что 1 тип ПД реализуют Ph^+ клетки с высоким индексом эффективности пролиферации P/D при низком содержании нейтрофилов, созревающих без деления.

Таблица 1

Эффективность пролиферации и дифференцировки Ph^+ клеток 1 типа в культуре $P/D > 1$. Скорость накопления и концентрация пролиферирующих незрелых клеток, P , больше, чем клеток, созревающих без деления, D (условно зрелых). Концентрация $[нз] > [з]$.

п/п	Образцы мононуклеаров, выделенных из ПК или КМ больных ХМЛ			Показатели эффективности P/D в процессе пролиферации и дифференцировки			Итоги наблюдения больного. Длительность и вид эффективного лечения до прогрессии ХМЛ
	№ образца ПК или КМ, № рис. или табл.	Диагноз при отборе пробы	Тип bcr/abl РНК. Лейкоцитоз $\times 10^9/л$; %бластов	Продолжительность этапа $P/D > 1$, сут.	P/D^{***} , $[нз]/[з]$	$[Бласты]/[Миелоциты]$	
1	1.1 ПК Рис. 1	ХФ	b3a2 L115; бласты 3%	14 сут.	12–4 4–1	2–0,1 0,1–0,3	9 мес. до миелоидного БК; реаферон цитозар, ПХТ**, гливек; %бластов снижен с 34 до 16 %; 2 Ph^+ хромосомы. Летальный исход
2 3	1.2 КМ ПК, Рис. 2	ХФ	b3a2 L 72 бласты 3%	8 сут. до 8 сут.	1,2–1,6 2,4–1	0,3–3 0,1–0,3	3,5 г от резистентности до краткой ПКГР ⁺ . Реаферон, гливек 400; далее по н/вр гливек 600. ГОМ* до отбора пробы
4 5	1.3 КМ ПК, Рис. 3	ФА	b2a2 бласты 17%	> 8 сут.	3–9 1–13	>0,1 >0,1	Резистентность ко всему; саркоматизация, экстрамедулярное поражение лимфоузлов; БК летальный исход. До отбора пробы ПХТ**
6	1.4 ПК, Табл. 4	БК лимфоидного типа	b2a2 бласты 30%	> 6 сут.	>20-2	10–0,4	Лимфоидный БК, ПХТ; 6 месяцев ХФ, 3 месяца БК; летальный исход. До отбора пробы ПХТ**
7	1.5 ПК, Рис. 4	ХФ	b3a2 L 175 бласты 5%	до 8 сут.	1,2–2,5	$\approx 0,5$ $\approx 0,3$	ХФ; 7 лет ГОМ*, гливек; БЦГО ⁺⁺ ПКГР ⁺ до н/вр. ГОМ* до отбора пробы

Лечение: *гидроксимочевина;
 **полихимиотерапия; ⁺полная клинико-гематологическая ремиссия; ⁺⁺большой цитогенетический ответ.
 ***Для значений P/D указан интервал изменений по ходу кинетической кривой.

Эффективность пролиферации и дифференцировки Ph⁺ клеток 2 типа в культуре P/D ≤ 1.

Скорость накопления и концентрация нейтрофилов, созревающих без деления, D, больше, чем пролиферирующих незрелых клеток, P. Концентрация [з] > [нз].

№ п/п	Образцы мононуклеаров, выделенных из ПК или КМ больных ХМЛ			Показатели эффективности P/D в процессе пролиферации и дифференцировки			Итоги наблюдения больного. Длительность и вид эффективного лечения до прогрессии ХМЛ
	№ образца ПК или КМ	Диагноз при отборе пробы	Всг/abl PНК, Лейкоцитоз × 10 ⁹ /л; % бластов	Продолжительность этапа P/D < 1, сут.	P/D***, [нз]/[з]	[Бласты]/[Миелоциты]	
1	2.1 ПК	ХФ	b3a2 L 188-145	> 6 сут.	0,3-0,8	0-0,06	ХФ; ~ 3 г без лечения, 2,5 г в ПКГР ⁺ ; Полиплоидия с Ph ⁺ хромосомой; гливек-800 н/вр. ГОМ* до отбора пробы
2	2.2 КМ	ХФ	b3a2	> 5 сут.	0,8-1,5	0,03-0,21	Данных нет. По кинетике ПД* начало правого сдвига СЯ. ГОМ* 4 суток до отбора пробы
3	2.3 ПК	ХФ	b3a2	~6 сут.	0,4-1,0	0,15	Клинических данных нет, по кинетике ПД ^x ранняя стадия ХФ
4	2.4 ПК	ХФ, 2 группа риска типа	L165	~7 сут.	0,3-1, 2	0,06	6 лет реоферон, ПКГР+ и БЦГО++, Аллергия: гливек, снова реоферон и АН107 н/вр. До отбора пробы реоферон
5	2.5 ПК	ХФ	b2a2	До 7 сут.	0,5-1,1	0,1-0,2	Клинических данных нет. По значениям P/D пролиферативный потенциал приближается к 1 типу
6 7	2.6 ПК КМ	ХФ	b3a2	>9 сут.	0,2-1,0 0,3-1,0 (2)	0,03-0,14	Клинических данных нет. По значениям P/D пролиферативный потенциал в ПК на 2 этапе ПД* приближается к 1 типу
8 9	2.7 ПК КМ	ХФ	b2a2	~4-6 сут.	0,4-1,5 1,5	0,05-0,19	Дата анализа март 1999 г. Наблюдение 0,5 года. Резистентен к реоферону; нет ПКГР+.

Лечение:

*гидроксимочевина;

**полихимиотерапия; ⁺ полная клинико-гематологическая ремиссия; ⁺⁺ большой цитогенетический ответ. ПД^x – пролиферация и дифференцировка.

***Для значений P/D указан интервал изменений по ходу кинетической кривой.

Эффективность пролиферации и дифференцировки Ph⁺ клеток 3 типа в культуре, протекающей с чередованием: этапов P/D>1 на P/D< 1, скоростей накопления и концентраций пролиферирующих незрелых клеток, P, и нейтрофилов, созревающих без деления, D. Частота чередования этапов [нз] > [з] → [з] > [нз] → [нз] > [з] от 0,5 до 6 суток

№ п/п	Образцы моноклеаров, выделенных из ПК или КМ больных ХМЛ			Показатели эффективности P/D в процессе ПД ^x		Итоги наблюдения больного. Длительность и вид эффективного лечения до прогрессии ХМЛ
	№ образца ПК или КМ	Диагноз при отборе пробы	L–Лейкоцитоз ×10 ⁹ /л; % бластов	P/D*** [нз]/[з]	[Бласты]/[Миелоциты]	
1	3.1 КМ	ХФ	e1a2	1–2,5	0,1–0,2	Клинических данных нет. По кинетике выход в ФА и 1 тип Ph ⁺ клеток
2	3.2 ПК	ФА	b3a2 L 144, Tr.692	1,2–1,5	0,03–0,25	2 г по н/ в ГОМ*; гливек. По кинетике ПД* 3 тип Ph ⁺ клеток.
3 4	3.3 КМ ПК	ХФ	b3a2 L 194	12–0,5 1,5–1,0	0,2–0,6 0,6–0,3	7 лет; ХФ 2,2 года ГОМ, интерферон; ФА, гливек; ПКГР ⁺ Выход во 2 тип ПД ^x с высоким % СЯ в ПК.
5	3.4 КМ	ХФ	b2a2	0,4–1,6	0,03–0,1	2 г по н/время, ГОМ* и гливек 800. Проба после лечения ГОМ*
6	3.5 КМ	ХФ, 2 группа риска	L 165	0,3–3,5	0,2–0,6	6 лет; реаферон, гливек, снова реаферон и АН107; ПКГР и БЦГО; ФА или БК? Проба после реаферона
7	3.6 КМ	ХФ	b3a2	1,5–0,4	0,03–0,14	7 лет ХФ Гидреа, гливек; ПКГР, БЦГО. До отбора пробы 4 сут. ГОМ*
8	3.7 КМ ПК	ХФ	b2a2	2,5–0,7 1,4–2	0,1 0,5	Клинических данных нет; По кинетике ранняя стадия ХФ и выход во 2 тип с высоким %СЯ
9 10	3.8 КМ ПК	ХФ	b3a2 L 136, Tr.298	0,4–4 0,4	0,3 0,3	5 лет; ГОМ*, гливек 400 – 4 г. Обнаруживается 0,11% Ph ⁺ хромосомы. ПКГР, БЦГО. Проба после лечения ГОМ*
11	3.9 КМ	ХФ	b3a2	1,1	0,13	Нет данных. По кинетике ПД ^x начальная стадия ХФ
12	3.10 ПК	ФА	b3a2 L 258–14, Tr.880	0,7–1,4	0,02	2 г. гливек 800, высокая экспрессия b3a2; ПКГР. Наблюдается ингибирование СЯ. Проба после лечения ГОМ*
13 14	3.11 ПК КМ	ХФ, 1 группа риска	b3a2 L 120	0,3–1,6 0,8–1,0	<0,08	Ингибирование пролиферации миелоцитов и апоптоза СЯ нейтрофилами. Проба после 6 суток лечения ГОМ*
15	3.12 КМ	ХФ	b3a2	1,5–0,4–0,7	0,25	5 лет; ГОМ*, гливек 1,5 г. Проба после 7 сут лечения ГОМ*
16	3.13ПК	ХФ	b2a2	0,5–2,4	0,14	Нет данных
17	3.14 КМ	ХФ	Ph ⁺ нет хромосомы	0,7–1,3	0,11	Нет данных По кинетике ПД ^x предполагается начальная стадия ХФ

Лечение:

*гидроксимочевина;

**полихимиотерапия; + полная клинико-гематологическая ремиссия; ++большой цитогенетический ответ. ПД^x – пролиферация и дифференцировка.

***Для значений P/D указан интервал изменений по ходу кинетической кривой.

Таблица 4

Культивирование в течение 6 сут. Ph⁺ мононуклеаров, гранулоцитов и их составляющих, выделенных из ПК ХМЛ № 1.4 в фазе лимфоидного бластного криза, %

Ph ⁺ клетки	ПК исходная	Мононуклеары: выделены из ПК в градиенте плотности фиколла 1,077, %			Клетки: выделены из ПК в градиенте плотности фиколла 1,119, %		
		0	3	6	0	3	6
Время культивирования, сут.	0	0	3	6	0	3	6
Ph ⁺ лейкоциты живые	100±4,0	100±4,0*	50±2,6	45±2,5	100±5	79±4,5	36±2
Ph ⁺ лейкоциты погибшие	–	22±1,3	45,2±2	47,1±2,3	11±0,6	21,3±1,2	44,7±2,3
Гранулоциты: ∑ 1–6	58±3,0	48±2,5**	–	28±1,5	48±2,6	–	31±1,6
1. Бласты	16±1,5	43±2,2	–	13±0,7	25±1,2	–	5±0,5
2. Промиелоциты	–	0	–	9±0,1	0	–	19±1
3. Миелоциты	2±0,1	3±0,15	–	2±0,1	4±0,2	–	3±0,2
4. Метамиелоциты	0	0	–	2±0,1	4±0,2	–	0
5. Палочкоядерные	22±1,1	0		2±0,1	9±0,6	–	0
6. Сегментоядерные	18±0,9	0	–	0	4±0,2	–	4±0,2
Лимфоциты	24±1,7	49±2,5	–	58±2,9	44±2,2	–	51±2,6
Гранулоциты незрелые	18±1,0	46±2,4	–	24±1,4	29±1,5	–	24±1,3
Нейтрофилы зрелые	40±2,1	0,2±0,1	–	4±0,2	17±0,8	–	4±0,3
P/D	0,45	>20	–	6	1,7	–	6

*начальная концентрация лейкоцитов 1×10^6 клеток /мл;

**начальная концентрация гранулоцитов $0,43 \times 10^6$ клеток/мл.

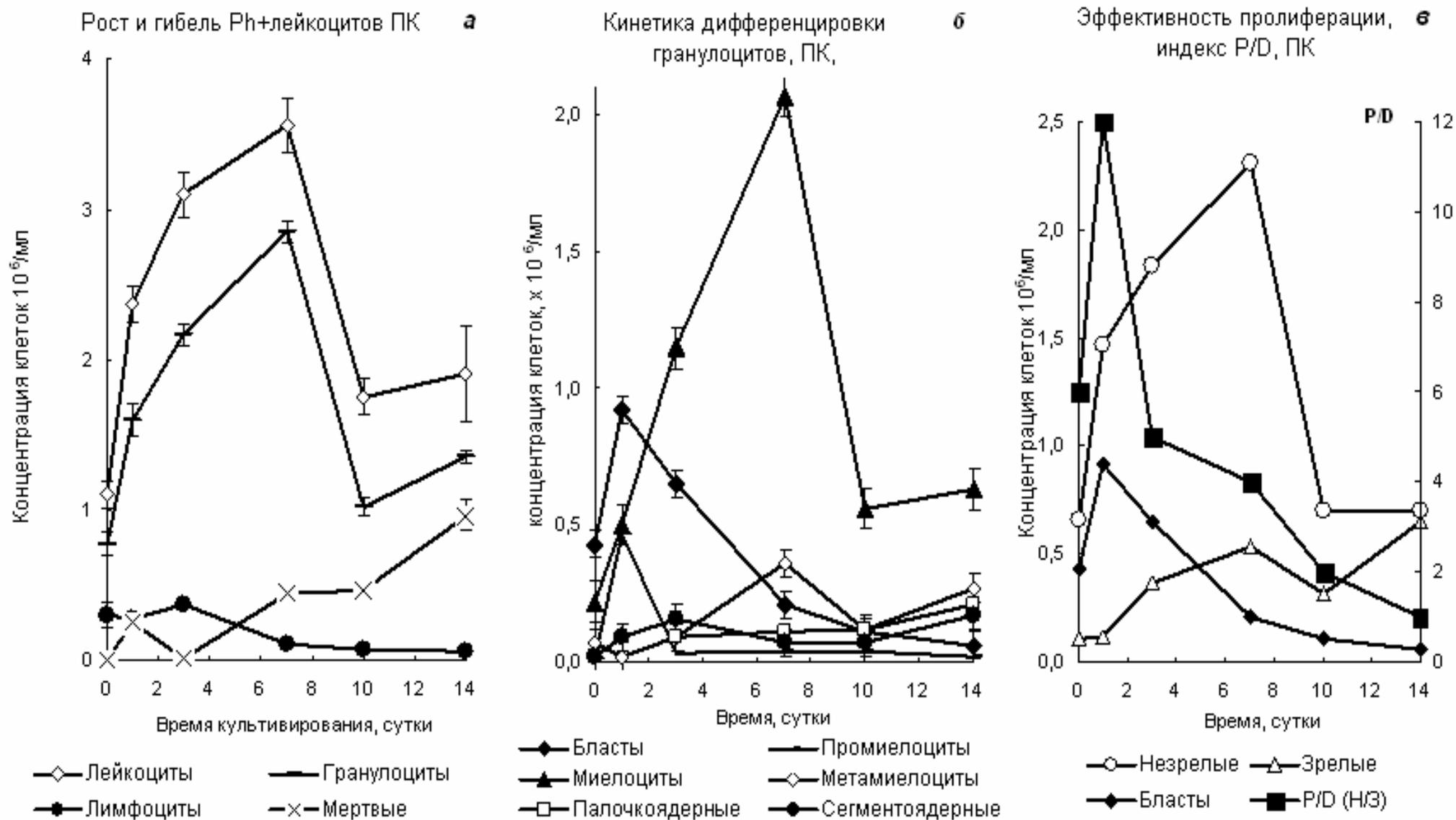


Рис. 1. Кинетические кривые пролиферации и дифференцировки Rh⁺клеток (мононуклеаров) из ПК больного ХМЛ в хронической фазе № 1.1:

Кривые отражают скорости накопления и расходования Rh⁺лейкоцитов, гранулоцитов и их субпопуляций: Rh⁺лейкоцитов (а), гранулоцитов и их субпопуляций (б), сумма пролиферирующих клеток, P [нз], и клеток, созревающих без деления, D [з] (в); индекс эффективности P/D – как соотношение скоростей накопления пролиферирующих, P, и созревающих, D, клеток (в); К клеткам P относили миелоидные клетки-предшественники, бласты, промиелоциты и миелоциты; к клеткам D – метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы (ММ, ПЯ и СЯ) соответственно.

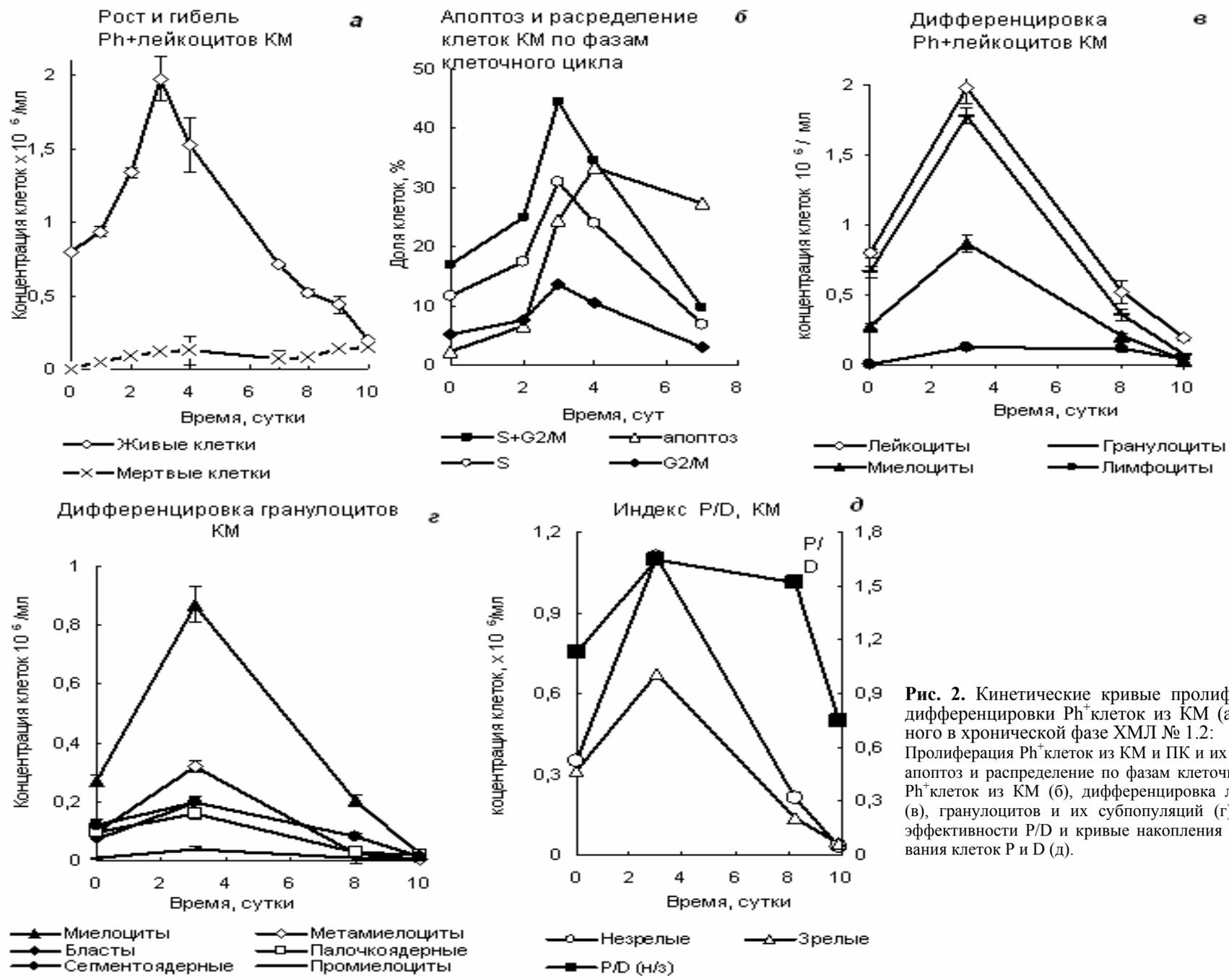


Рис. 2. Кинетические кривые пролиферации и дифференцировки Rh⁺клеток из КМ (а-д) больного в хронической фазе ХМЛ № 1.2: Пролiferация Rh⁺клеток из КМ и ПК и их гибель (а), апоптоз и распределение по фазам клеточного цикла Rh⁺клеток из КМ (б), дифференцировка лейкоцитов (в), гранулоцитов и их субпопуляций (г); индексы эффективности P/D и кривые накопления и расходования клеток P и D (д).

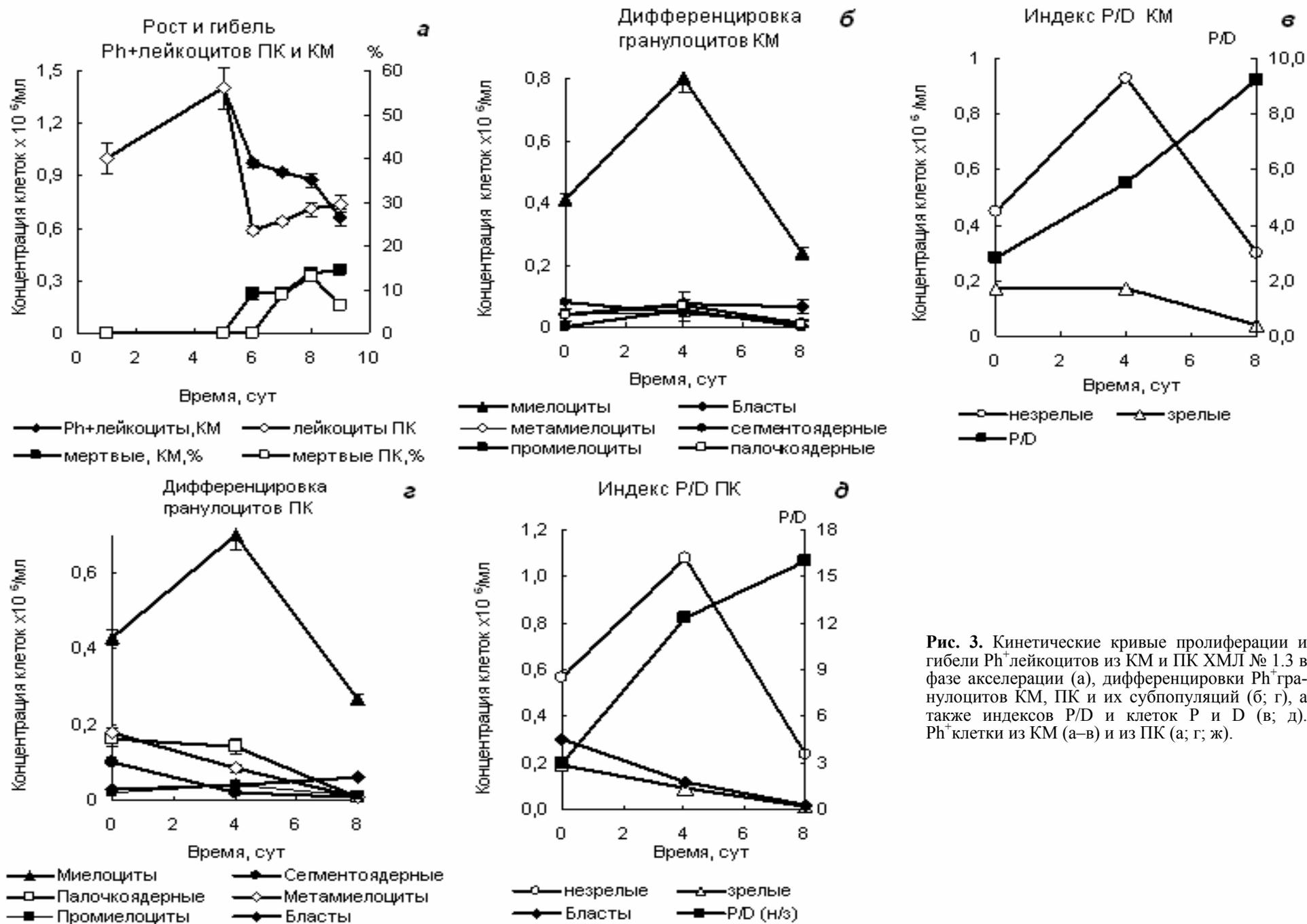


Рис. 3. Кинетические кривые пролиферации и гибели Rh⁺лейкоцитов из КМ и ПК ХМЛ № 1.3 в фазе акселерации (а), дифференцировки Rh⁺гранулоцитов КМ, ПК и их субпопуляций (б; г), а также индексов P/D и клеток P и D (в; д). Rh⁺клетки из КМ (а–в) и из ПК (а; г; ж).

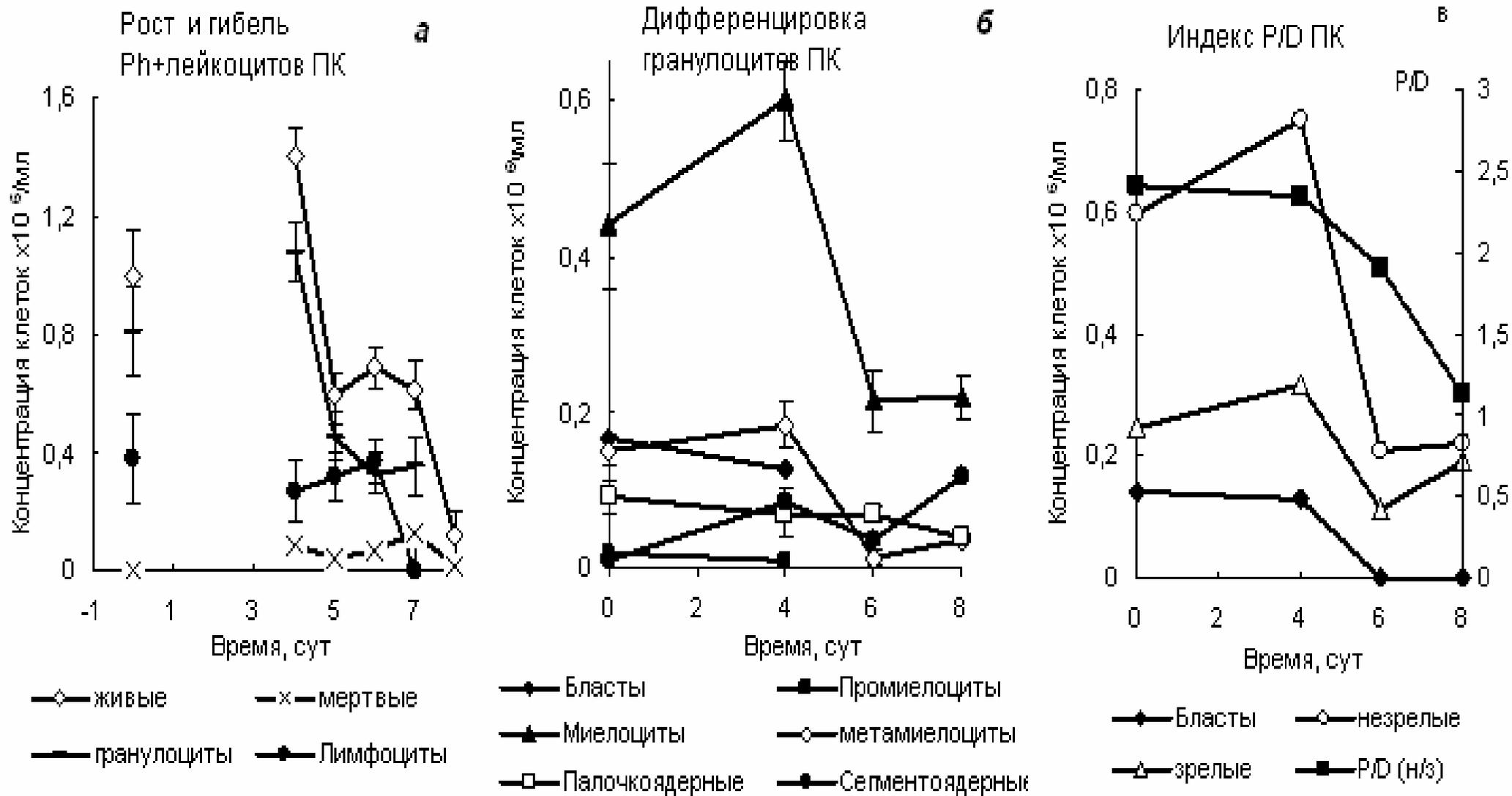


Рис. 4. Кинетические кривые роста концентрации Rh⁺клеток из ПК от больного в ХФ ХМЛ № 1.5 и их гибели (а), дифференцировки гранулоцитов и их субпопуляций (б); индекса P/D и клеток P и D (в)

Очевидно, чем выше эффективность пролиферации P/D и скорость пролиферации, тем выше пролиферативный потенциал Ph^+ клеток, тем ниже накопление СЯ при созревании. Эти параметры определяют преимущество пролиферации над созреванием при ПД Ph^+ клеток 1 типа.

Полученные результаты согласуются с известными данными об активной пролиферации клеток из КМ и ПК ХМЛ. Активацию пролиферации клеток к культуре ранее наблюдали в присутствии факторов роста [3; 12; 21; 27; 30; 31; 45]. По совокупности литературных данных и наших результатов эффективность пролиферации (индекс P/D) Ph^+ клеток 1 типа зависят от фазы ХМЛ, от распределения Ph^+ клеток в фазах S+G₂/M клеточного цикла, скорости и степени апоптоза.

Кинетика дифференцировки Ph^+ клеток 1 типа представлена кинетическими кривыми накопления и расходования Ph^+ лейкоцитов (их составляющих гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов), а также кинетическими кривыми субпопуляций гранулоцитов: бластов, промиелоцитов, миелоцитов, ММ, ПЯ и СЯ нейтрофилов (рис. 1б–в; 2в–г; 3б–д; 4б; табл. 1). При ХМЛ Ph^+ лейкоциты содержат 70–90 % миелоидных клеток [1; 7], что согласуется с кинетическими данными дифференцировки Ph^+ клеток в культуре здесь и в [3]. В кинетических кривых Ph^+ гранулоцитов 1 типа видно пониженное содержание зрелых клеток; иногда они почти отсутствуют, особенно СЯ нейтрофилы при ФА и БК ХМЛ. При ПД Ph^+ клеток от ХФ ХМЛ СЯ накапливаются до концентрации не выше 2×10^5 клеток/мл (рис. 2г; табл. 4); в случаях рис. 1б; 3в–г; 4б концентрация СЯ на порядок ниже. За накоплением нейтрофилов следует заметное увеличение доли апоптоза гранулоцитов (рис. 2б–г).

Из Ph^+ клеток ХФ и ФА ХМЛ наибольшего накопления достигают миелоциты (рис. 1–3; 5), а при БК повышено содержание бластов и промиелоцитов (табл. 4). Это вполне согласуется с данными [48] об основном содержании миелоцитов в миелоидных клетках при ХФ ХМЛ. Из клинических исследований при прогрессии ХМЛ хорошо известен сдвиг в сторону образования незрелых клеток («сдвиг влево», «бластный сдвиг») с характерным повышением содержания в первую очередь миелоцитов, далее промиелоцитов и миелобластов, а также низкое содержание ПЯ и СЯ нейтрофилов при ФА и БК ХМЛ [1; 7; 48]. Отметим, что по кинетическим кривым ПД Ph^+ клеток 1 типа из ПК ХФ ХМЛ № 1.1 (рис. 1) обнаружены свойства близкие БК миелоидного типа; клинически БК миелоидного типа у этого больного был выявлен на полгода позже.

Любопытно, что Ph^+ клетки, полученные от БК ХМЛ № 1.4 (табл. 4), пролиферируют в культуре менее активно, чем клетки, полученные от ХФ ХМЛ (табл. 1; рис. 2; 4). При культивировании Ph^+ лейкоцитов № 1.3 от ХФ ХМЛ клеточность возрастает в 1,25 раза (рис. 3), а для Ph^+ лейкоцитов от ХМЛ БК № 1.4 она только уменьшается (табл. 4). В обоих случаях видно очень низкое накопление ПЯ и СЯ нейтрофилов и почти полное их расходование по ходу ПД. В случае ХФ ХМЛ (рис. 3) еще сохраняется высокая концентрация миелоцитов, а при БК ХМЛ (табл. 4) гранулоциты уже на 79 % состоят из промиелоцитов и бластов и содержат только 7 % миелоцитов. Накопление зрелых нейтрофилов тормозит пролиферацию Ph^+ клеток 1 типа, а их гибель повышает эффективность пролиферации. Отметим, что в исходной ПК ХМЛ № 1.4, содержащей ~ 40 % ПЯ и СЯ нейтрофилов, индекс P/D равен 0,45. В мононуклеарах из этой ПК в отсутствии нейтрофилов P/D достигает 20.

Итак, при ПД Ph^+ клеток 1 типа протекает эффективная пролиферация, которая зависит от индивидуального источника Ph^+ клеток с их онкогеном *bcr/abl*, от вида и содержания в них клеток-предшественников, а также стадий ХМЛ. ПД Ph^+ клеток 1 типа характеризуется высоким индексом эффективности P/D, значительным накоплением миелоцитов или бластов, пониженным содержанием нейтрофилов, созревающих без деления, апоптоз которых способствует увеличению скорости и эффективности пролиферации. Отметим, что транскрипция *bcr/abl* при ПД Ph^+ клеток 1 типа определена в [3], где показано совпадение максимумов транскрипции этого гена и индекса эффективности P/D на 1 сут. Ph^+ клеток из ХМЛ № 1.1. Индивидуальные различия в закономерностях ПД при культивировании Ph^+ клеток разных от больных ХМЛ в разных фазах с их индивидуальной генетической программой, проявляющиеся в одинаковых условиях суспензионной культуры, изолированной от многофакторной регуляции *in vivo*, ранее не изучались. С помощью анализа скоростей ПД Ph^+ клеток от индивидуальных больных ХМЛ в суспензионной культуре обнаружены три типа Ph^+ клеток, встречающиеся у разных больных ХМЛ с различиями в пролиферации и созревании и, очевидно, в их регуляции. По кинетике ПД Ph^+ клеток данного больного ХМЛ в культуре можно судить о ПД не только до лечения больного, но и о ПД в процессе болезни и терапии, так как механизм ПД довольно стабильно воспроизводится со всеми тонкостями регуляции ПД клеток от разных больных.

Параметры пролиферации и созревания при ПД Ph^+ лейкоцитов и их субпопуляций, полученные нами при культивировании проб ПК и КМ от многих индивидуальных больных ХМЛ с помощью кинетического анализа ПД, согласуются с многими характеристиками, полученными в результате клинических исследований, основанных на данных многочисленных больных в разное время болезни [1; 7; 21; 30; 33; 34; 45; 47; 59]. Пониженное накопление нейтрофилов в культуре клеток из КМ и ПК при бластном кризе ХМЛ ранее обнаружено в клинических исследованиях, медицинской практике, а также в опытах с суспензионными культурами клеток от ХМЛ и названо дефектным созреванием [1; 7; 20; 33; 34; 45; 58]. Результаты исследования кинетики ПД в культуре показывают, что дефектное созревание связано с эффективной пролиферацией Ph^+ клеток 1 типа и гибелью зрелых нейтрофилов в условиях активного апоптоза последних при ПД. Отметим, что индекс эффективности P/D как отношение скоростей пролиферации и созревания Ph^+ клеток в течение одного цикла ПД субклона Ph^+ клеток величина переменная. Это соответствует многоступенчатому превращению субпопуляций с уменьшением пролиферативного потенциала, из которых три последних субпопуляции не способны к делению. Проллиферативный потенциал Ph^+ клеток 1 типа можно оценить по индексу P/D и доле Ph^+ клеток в S+G₂/M фазах клеточного цикла для одного цикла ПД Ph^+ клеток трех типов от разных источников. Вероятно, пролиферативный потенциал Ph^+ клеток также величина не постоянная.

Роль *bcr/abl* онкогена и тирозинкиназы p210 в изменениях путей сигнальной трансдукции [20; 24–28; 32; 37; 38; 40–42; 44; 52–53], их влияние на самоподдержание гемопоза и на параметры клеточного цикла [46; 58], на механизмы апоптоза [4–6; 17; 18; 38; 39; 41] и регуляцию пролиферации Ph^+ клеток цитокинами [4–6; 12; 25; 26; 35; 43] указывает на участие *bcr/abl* онкогена и тирозинкиназы p210 в клеточных и молекулярных механизмах регуляции ПД Ph^+ клеток.

Об этом свидетельствуют работы на клеточных линиях Ph⁺клеток [19; 20; 25; 48; 51]. На клетках от больных ХМЛ об этом также свидетельствуют различия в эффективности ПД в культуре первичных Ph⁺клетках от разных больных ХМЛ, обнаруженные в данной работе. Полученные здесь результаты можно использовать для уточнения диагноза, прогнозирования течения ХМЛ и выбора терапии данного больного. Кинетический подход к ПД позволяет определить эффективность P/D, пул пролиферирующих клеток при ПД и по этим данным оценить путь потенциальной прогрессии ХМЛ. Результаты исследования демонстрируют информативный подход для изучения клеточной и молекулярной регуляции ПД гемопоэтических клеток. Отметим, что исследование роли и встречаемости обнаруженных общих черт и различий в ПД при ХМЛ отдельная самостоятельная задача.

Заключение

На примере Ph⁺клеток от индивидуальных больных ХМЛ в разных фазах с предполагаемыми мутациями в онкогене *bcr/abl*, сопровождающими ХМЛ, разработан кинетический подход к детальному исследованию индивидуальных особенностей Ph⁺клеток по скорости и эффективности пролиферации и созревания при ПД в культуре.

Литература

1. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С., Рукавицын О.А. Хронический миелолейкоз. – СПб: Специальная литература, 1998. – 463 с.
2. Абрамов М.Г. Гематологический атлас, – М., Медицина, 1985. – 344 с.
3. 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 // Цитология. – 2007. – Т. 49. – С. 889–900.
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. Механизмы апоптоза клеток крови // Лабораторная медицина. – 2001. – № 4. – С. 47–54.
6. Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста. В кн.: Биологические основы противоопухолевой терапии. – М.: Агат-Мед, 2001. – С. 5–32.
7. Руководство по гематологии под ред. А.И. Воробьева. – Т.1. – М.: Ньюдиамед, 2002. – 280 с.
8. Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Ахлынина Т.В. и др. Экспрессия онкогена BCR/ABL и p53-индуцированный апоптоз в суспензионных культурах гемопоэтических Ph⁺ клеток при хроническом миелолейкозе // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 4. – С. 29–38.
9. Гринева Н.И., Барышников А.Ю. и др. Кинетика экспрессии антигенов в процессе пролиферации и дифференцировки Ph⁺клеток периферической крови при ХМЛ в культуре // РБЖ. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 21–32.
10. Козинец Г.И., Котельников В.М. Кинетика гемопоэза и ее клиническое значение // Сов. медицина. – 1983. – № 4. – С. 3–77.
11. Котельников В.М., Козинец Г.И., Касаткина В.В., Ковалевская Н.П. Кинетика гранулоцитопоза. В кн.: Кинетические аспекты гемопоэза. – Томск: Изд. Томского государственного университета, 1982. – С. 149–211.
12. Натан Д.Г., Зифф К.А. Регуляция кроветворения // Гематология и трансфузиология. – 1994. – Т. 39, № 2. – С. 3–10.
13. Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. и др. Цитофлуориметрический метод оценки апоптоза активированных лимфоцитов периферической крови человека с помощью пропидиум иодида. В кн.: Применение проточной цитофлуориметрии для оценки функциональной активности... – М.: МЗ РФ, 2001. – С. 48–53.
14. Розмарин А.Д. Лейкоциты. В кн.: Патолофизиология крови. – М.: BINOM Publishers, 2000. – С. 123–148.
15. Шмаров Д.А., Козинец Г.И. Способы анализа клеточного цикла при помощи проточной цитофлуориметрии. В кн.: Лабораторно-клиническое значение проточного цитометрического анализа крови. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – С. 49–65.
16. Amarante-Mendes G.P., Naekyung Kim C., Liu L. et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3 // Blood. – 1998. – Vol. 91. – P. 1700–5.
17. Bedi A., Zehnbauser B.A., et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents // Blood. – 1994. – Vol. 83. – P. 2038–44.
18. Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C et al. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in CML // Blood. – 1995. – Vol. 86. – P. 1148–58.
19. Brandford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. High frequency of point mutations clustered within ATP-binding region in CML or Ph⁺AML patients who develop imatinib resistance // Blood. – 2002. – Vol. 99. – P. 3472–5.
20. 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.
21. Chervenick P.A., Boggs D.R. Granulocyte kinetics in CML // Ser. Hematol. J. – 1968. – № 3. – P. 27–37.
22. Clarkson B., Strife A., Perez A. et al. Integration of molecular and biological abnormalities in quest for selective treatment of CML // Leukemia & Lymphoma. – 1993. – Vol. 11. – P. 81–100.

Обнаружено 3 типа Ph⁺клеток, различающихся соотношением скоростей и эффективности пролиферации и созревания, где индекс эффективности P/D количественно выражает соотношение скоростей пролиферации и созревания.

При 1 типе Ph⁺клеток P/D ≥ 1, при 2 типе P/D ≤ 1 продолжительное время ~7 сут. При 3 типе Ph⁺клеток за тот же период времени этапы пролиферации и созревания со своими индексами P/D неоднократно чередуются. Изучена ПД Ph⁺клеток 1 типа с P/D > 1–2 ÷ 20 и долей Ph⁺клеток в S+G₂/M фазах клеточного цикла ≥ 20–45 %, которая приводит к повышенному накоплению миелоцитов, промиелоцитов и/или бластов при низком накоплении нейтрофилов, созревающих без деления. Чем ниже содержание нейтрофилов, созревающих без деления, тем выше эффективность пролиферации, тем серьезнее прогрессия ХМЛ, из КМ или ПК которых выделены Ph⁺клетки. Ph⁺клетки 1 типа получены от больных ХМЛ в фазах ФА, БК и активно прогрессирующей ХФ ХМЛ и составляют пятую часть исследованных Ph⁺клеток.

Показано, что индекс P/D переменная величина в течение цикла ПД субклона Ph⁺клеток, что соответствует многоступенчатым превращениям клеток с уменьшением пролиферативного потенциала, из которых три последних субпопуляции не способны к делению.

23. *Clarkson B., Strife A.* Linkage of proliferative maturational abnormalities in CML and relevance to treatment // *Leukemia*. – 1993. – Vol. 7. – P. 1683–721.
24. *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. 4102–4110.
25. *Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M.* Structural and signaling requirements for bcr-abl-mediated transformation and inhibition of apoptosis // *Mol. cell. biology*. – 1995. – 10. – P. 5531–41.
26. *Dean P.N.* A simplified method of DNA distribution analysis // *Cell Tissue Kinet.* – 1980. – Vol. 13 – P. 299–302.
27. *Deininger M.W.N. et al.* The molecular biology of chronic myeloid leukemia // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – P. 3343–56.
28. *Deininger M.W.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.
29. *Dublez L., Eymin B., Sordet O. et al.* ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation // *Blood*. – 1998. – Vol. 91. – P. 2415–22.
30. *Elias L., Greenderg P.* Divergent pattern of marrow cell suspension culture in the myeloid leukemia: correlation of vitro findings with clinical features // *Blood*. – 1977. – Vol. 50. – P. 263–74.
31. *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.
32. *Gesbert F., Griffin J.D.* Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5 // *Blood*. – 2000. – Vol. 96 – P. 2269–76.
33. *Golde D., Cline M.* Human preleukemia: identification a maturation defect *in vitro* // *New Engl. J. Med.* – 1973. – Vol. 288. – P. 1083–6.
34. *Golde D.W., Byers L.A., Cline M.J.* Chronic myelogenous leukemia cell growth and maturation in liquid culture // *Cancer Research*. – 1974. – Vol. 34. – P. 419–23.
35. *Goldman J.M., Th'ng K.G., Catovsky D., Galton D.A.D.* Production of colony stimulating factor by leukemic leukocytes // *Blood*. – 1976. – Vol. 47. – P. 381–8.
36. *Guzman M.L., Jordan C.T.* Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia // *Cancer Control*. – 2004. – Vol. 11(2) – P. 97–104.
37. *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.
38. *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.
39. *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.
40. *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*. – Vol. 354. – P. 657–67.
41. *Lotem J., Sachs L.* Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes // *Leukemia*. – 1996. – Vol. 10. – P. 925–31.
42. *Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N.* Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products // *Science*. – 1990. – Vol. 247. – P. 1079–82.
43. *Melo J.V.* The diversity of the BCR-ABL fusion proteins... // *Blood*. – 1996. – Vol. 88. – P. 2375–84.
44. *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.
45. *Ogawa M., Fried J., Sakai Y. et al.* Studies of cellular proliferation in human leukemia. V1. The proliferative activity, generation time, and emergence time of neutrophilic granulocytes in CML // *Cancer*. – 1970. – Vol. 25. – P. 1031–49.
46. *Passegué E., Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Weissman I.L.* Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemia's a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 11842–9.
47. *Perry S., Moxly J.H., Weiss G.H., Zelen M.* Studies of leukocyte kinetics by liquid scintillation counting in normal individuals and patients with chronic myeloid leukemia // *J. Clinical Investigation*. – 1966. – Vol. 45(9). – P. 1388–99.
48. *Primo D., Flores J., Quijano S. et al.* Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia // *Brit. J. Haematol.* – 2006. – Vol. 135. – P. 43–51.
49. *Satler M., Mohi M.G., Pride Y.B. et al.* Critical role for Gab2 in transformation by bcr/abl // *Cancer cell*. – 2002. – Vol. 1. – P. 479–92.
50. *Selleri C., Maciejewski J.P., Pane F. et al.* Fas-mediated modulation of bcr/abl in CML results in differential effects on apoptosis // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – P. 981–9.
51. *Sherbenou D.W., Hantschel O., Turaga L. et al.* Characterization of bcr-abl deletion mutants CML patients // *Leukemia*. – 2008. – Vol. 22. – P. 1184–90.
52. *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. 247–554.
53. *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.
54. *Skipper H.E., Perry S.* Kinetics of normal leukemic leukocyte population and relevance to chemotherapy // *Cancer Res.* – 1970. – Vol. 30. – P. 1883–97.
55. *Stoklosa T., Poplawski T., Koptyra M. et al.* Bcr/abl inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – P. 2576–80.
56. *Strife A., Lambek C., Wisniewski D. et al.* Proliferative potential of subpopulation of granulocyte-macrophage progenitor cells in normal and CML patients // *Blood*. – 1983. – Vol. 62. – P. 389–97.
57. *Strife A., Lambek C., Wisniewski D. et al.* Discordant maturation as the primary biological defect in CML. // *Cancer Res.* – 1988. – Vol. 48. – P. 1035–41.
58. *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. Hematology*. – 1998. – Vol. 102. – P. 759–67.
59. *Whang-Peng J., Perry S., Knutsen T.A., Gart J.J.* Cell cycle characteristics, maturation and phagocytosis in vitro of blast cells from CML patients // *Blood*. – 1971. – Vol. 38. – P. 153–241.

УДК 615.277.3+[615.371]:612.112

*Е.А. Лебединская¹, Л.Ф. Лосева², Д.Н. Гусин¹, Н.К. Ахматова², И.Б. Семёнова², О.В. Лебединская¹***ВЛИЯНИЕ ВАКЦИНЫ ВП-4 НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ**¹ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера МЗ РФ», кафедра гистологии, Пермь;²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва**Контактная информация:**

Лосева Любовь Федоровна, младший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин

адрес: 121552, г. Москва, Рублевское шоссе, 109-5-98; **тел.** +7(499)-149-76-85; **моб.** +7(916)-812-72-88**e-mail:** L_losseva@hotmail.ru

Статья поступила 07.06.2009, принята к печати 23.10.2009.

Резюме

В работе исследовалось иммуносупрессивное действие циклофосфана, введение которого в определенных дозах мышам линии СВА приводило к значительному уменьшению абсолютного количества лимфоцитов в периферической крови и селезенке, изменению субпопуляционного состава лимфоцитов и снижению их функциональной активности. Показана возможность коррекции вызванных циклофосфаном изменений с помощью отечественного иммуномодулятора бактериального происхождения Иммуновак ВП-4, дающего быстрый нормализующий эффект. Это может иметь большое значение для предупреждения инфекционных осложнений у онкологических больных с проявлениями индуцированной химиопрепаратами иммуносупрессии. Учитывая вышеизложенное, а также полученные ранее данные о способности Иммуновак ВП-4 стимулировать противоионфекционный и противоопухолевый иммунитет, представляется целесообразным проведение клинических испытаний этого препарата для профилактики нарушений иммунного статуса у онкологических больных после проведения курсов химиотерапии.

Ключевые слова: циклофосфан, цитостатики, индуцированная иммуносупрессия, Иммуновак ВП-4, лимфоциты, иммунофенотип, цитотоксическая активность.*E.A. Lebedinskaya¹, L.F. Loseva², N.K. Ahmatova¹, I.B. Semenova², O.V. Lebedinskaya², M.V. Kiselevskiy¹***THE INFLUENCE OF VACCINE VP-4 ON PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF MONONUCLEAR LEUCOCYTES DURING INDUCED IMMUNOSUPPRESSION**¹E.A. Vagner State Medical Academy, Perm²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of RAMS, Moscow**Abstract**

Immunosuppressive activity of cyclophosphan was evaluated at Wistar CBA mice. Injection of cyclophosphan induced a significant decrease of lymphocytes in peripheral blood samples and in spleen; subpopulations of lymphocytes were changed and its functional activity was reduced. Immunovak VP-4, bacterial immunomodulator, rapidly corrects cyclophosphan-induced changes. The observed effect may play a significant role at prevention of infectious complications after chemotherapy-induced immunosuppression. Based on the above mentioned data that Immunovak is capable to stimulate antiinfectious and antitumour immune response we conclude that it is important to perform clinical trial to investigate Immunovak VP-4 capability to prevent immune response failure after chemotherapy.

Key words: cyclofosfan, cytostatics, induced immunosuppression, Immunovak VP-4, lymphocytes.**Введение**

При лечении злокачественных новообразований на иммунную систему больных супрессивное действие оказывают множество факторов, включая сам опухолевый процесс, химиотерапевтические препараты и кортикостероиды. Оценивая влияние ХТ на иммунную систему, важно дифференцировать иммунодепрессию и миелосупрессию [7]. Многие химиотерапевтические агенты обладают миелосупрессивным действием, ингибируя продукцию форменных элементов крови в костном мозге.

Иммунодепрессия проявляется ослаблением иммунного ответа из-за уменьшения количества В- и Т-лимфоцитов, а также снижением содержания отдельных субпопуляций лимфоцитов даже при нормальном абсолютном количестве лимфоидных клеток. На фоне индуцированной химиопрепаратами

иммуносупрессии происходит истощение Т-лимфоцитов. Е. Azuma et al. [4] показали, что снижение содержания CD4⁺.

Т-клеток отмечается в течение пяти лет после проведения химиотерапии. При действии цитостатиков CD8⁺ Т-лимфоциты приходят в исходное состояние значительно быстрее, чем CD4⁺ Т-клетки [9]. Однако установлено, что после химиотерапии относительно быстрое увеличение в периферической крови CD8⁺ Т-клеток не сопровождается восстановлением нормальной функции данного подтипа лимфоцитов. Значительная часть таких клеток характеризуется сниженной экспрессией ко-стимулирующих молекул CD28 [10]. Экспрессия антигенов CD28 на CD8⁺ Т-клетках не восстанавливается в течение года после окончания химиотерапии. Несмотря на снижение числа Т-лимфоцитов, оставшиеся клетки, могут активизироваться и продуцировать цитокины [5; 6].

Вследствие химиотерапии снижается и количество НК, и их цитостатическая активность, причем процесс восстановления у них идет быстрее, чем у других подтипов лимфоцитов [3; 8; 11; 13; 15]. Эксперименты показали, что химиопрепараты подавляют пролиферативную активность селезеночных лимфоцитов, и этот эффект дозозависим. Учитывая вышесказанное, представляется целесообразным провести исследования иммунологических параметров при использовании цитостатиков для поиска адекватных методов коррекции вызываемых ими изменений.

В существующих подходах применяются различные цитокины, чаще всего – колониестимулирующие факторы GM-CSF и G-CSF, сокращающие длительность нейтропении, но при этом, как было показано авторами, не влияющие на состояние здоровья и продолжительность жизни больных [12].

Некоторые исследования продемонстрировали положительное действие потенциала цитокинов, которые обычно используются для коррекции иммунной системы. Например, ИЛ-2 в сочетании с G-CSF не только нормализовали число нейтрофилов, но и повышали количество и активность эффекторов противоопухолевого иммунитета – НК и Т-лимфоцитов [14].

Данные клетки могут содействовать устранению остаточных явлений при лечении отдельных видов злокачественных новообразований. Проведенные ранее экспериментальные исследования выявили, что отечественный препарат, поликомпонентная вакцина бактериального происхождения Иммуновак ВП-4, оказывает стимулирующее действие на клеточное звено иммунитета и обладает противоинфекционной и противоопухолевой активностью [1; 2].

На основании вышеизложенного была определена цель данной работы – изучение влияния вакцины Иммуновак ВП-4 на иммунофенотип и функциональную активность лимфоцитов селезенки мышей на фоне индуцированной ЦФ иммуносупрессии.

Материалы и методы

Объекты исследования

Исследования проведены на 240 мышах линий СВА и Валб/с в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Препараты и способы их введения

В исследованиях использованы препараты: ЦФ Лэнс (Россия) и поликомпонентная вакцина Иммуновак ВП-4 (НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН, г. Москва), состоящая из антигенных компонентов *St. aureus*, *Kl. pneumoniae*, *Pr. vulgaris* и *Esch. coli*.

Иммуносупрессию индуцировали внутрибрюшинным введением циклофосфана в дозе 100 мг/кг веса в 0,2 мл физ. р-ра, трехкратно, ежедневно. Иммуновак ВП-4 вводили в/б в дозе 200 мкг/мышь в 0,2 мл физ. р-ра однократно через 24 ч после завершения курса инъекций ЦФ, или в качестве контроля (без ЦФ) однократно внутрибрюшинно в той же дозировке в 0,2 мл физ. р-ра. Контрольной группой являлись интактные мыши. Селезенки мышей контрольной и трех экспериментальных групп исследовались через 48; 96 и 168 ч после введения иммуномодулятора.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов

Селезенки мышей гомогенизировали, добавляли среду 199. Полученную взвесь центрифугировали при 400 g в течение 30 мин, в градиенте плотности фиколл-урогафин («Pharmacia», США, $\rho=1,077$ г/см³). МЛ, образовавшие интерфазное кольцо, собирали

пипеткой и трехкратно отмывали в среде 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g. Концентрацию клеток доводили до 1×10^6 кл/мл.

Проточная цитометрия (FACS-анализ) и характеристика антител

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли методом проточной цитометрии с применением МКА против клеточных антигенов (Caltag Laboratories, США). Клетки отмывали холодным ФСБ с 1 %-ной ФТС и окрашивали FITC- и PE-мечеными МКА согласно инструкции. Окрашенные клетки отмывали 2 раза холодным ФСБ. Результаты учитывали на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США). На МЛ селезенки мышей исследовали уровни экспрессии молекул субпопуляций Т-клеток (CD3, CD4, CD8, CD4/CD25/Foxp3), В-лимфоцитов (CD19), НК, НКТ (CD3/НК) и белков МНС I и II классов. Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 5 000 клеток в гейте. Статистическую обработку данных проводили при помощи программного пакета WINMDI 2.8.

Цитотоксический тест

Для выявления цитотоксической активности МЛ селезенки использовали тест восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия ромида (МТТ-тест). Цитотоксическую активность МЛ определяли на линии клеток К-562.

Опухолевые клетки (3×10^4 в 1 мл) инкубировали в культуральной среде с МЛ в соотношении 1:5; 1:2; 1:1 в плоскодонных 96-луночных микропланшетах (Costar, Франция) 18 ч при 37 °С, в атмосфере 4,5 %-ного CO₂. Затем в лунки добавляли 5 %-ный витальный краситель МТТ (Sigma, США) и по оптической плотности при λ 540 нм, измеряемой на мультискане MS (Labsystem, Финляндия), рассчитывали процент лизиса опухолевых клеток (% цитотоксичности).

Культивирование клеток К-562

Клетки-мишени НК-чувствительной опухолевой линии К-562 (эритробластный лейкоз человека) культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 5 %-ной ФТС и 50 мкг/мл гентамицина при 37 °С, в атмосфере 4,5 %-ного CO₂.

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента, критерия Вилкоксона при помощи стандартного пакета статистических программ Windows 2003 (StatSoft 6.0).

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что введение мышам ЦФ приводит к резкому снижению содержания МЛ в селезенках мышей с максимумом на 2–3 сут после последней инъекции. Из табл. 1 видно, что в селезенке интактной мыши содержится 7203070 ± 32503 МЛ, в то время как после введения ЦФ из органа выделяется всего 1325000 ± 2569 МЛ. Введение мышам вакцины ВП-4 нивелирует данные изменения, поскольку в этом случае вызванная ЦФ лимфодеплеция имеет менее выраженный характер (из селезенки выделяется 3288000 ± 5560 МЛ). Аналогичная тенденция наблюдается в отношении клеточного состава периферической крови животных. У мышей, получавших ЦФ, отмечается выраженная нейтро- и лимфопения, а применение на этом фоне ВП-4 приводит к появлению значимого количества лейкоцитов в периферической крови.

Таблица 1

Количество МЛ, выделенных из селезенки мышей в группах 1-3

Группа мышей	Количество выделенных МЛ
Контроль	7200000±32503
Группа ЦФ	1325000±2569
Группа ЦФ+ВП-4	3288000±5560

Таблица 2

Влияние ВП-4 на НК-активность МЛ селезенки мышей с индуцированной ЦФ иммуносупрессией, %

t после введения, ч	Группа/препараты	НК-активность при соотношении клетка мишень/эффлектор		
		1:5	1:2	1:1
0	1/-	73,4±5,6	39,3±1,2	27,9±0,8
48	2/ЦФ	34,1±3,7*	20,1±2,2*	14,5±0,6*
	3/ЦФ+ВП-4	63,2±2,9**	40,8±2,7**	22,3±1,2**
96	4/ЦФ	39,6±1,2*	27,1±3,1*	9,3±0,1*
	5/ЦФ+ВП-4	57,3±2,4**	35,4±1,8	12,9±0,1*
168	6/ЦФ	52,7±3,1*	43,6±0,9	35,4±1,5
	7/ЦФ+ВП-4	49,5±1,9*	41,4±2,0	33,9±2,7

* Статистически значимые различия по сравнению с контролем (группой 1), p<0,05

**Статистически значимые различия между группами 2 и 3, 4 и 5, p<0,05

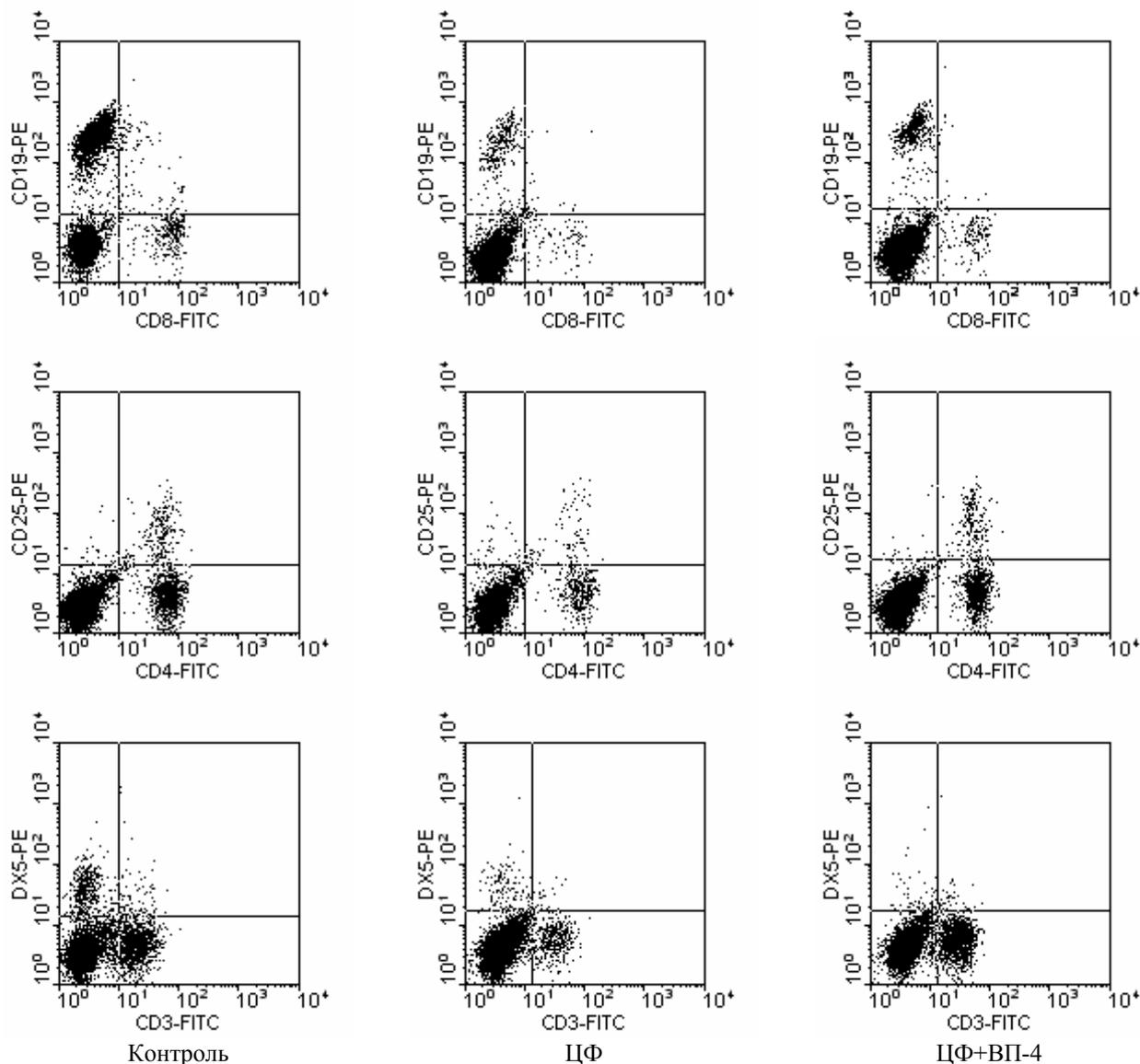


Рисунок Экспрессия поверхностных молекул CD19/CD8, CD25/CD4, DX5/CD3 мононуклеарных лейкоцитов селезенки мышей линии СВА:

в контроле, под влиянием ЦФ и при комбинированном введении ЦФ+ ВП-4.

Двойное прижизненное окрашивание МКА, мечеными FITC и PE.

На вторые сутки после последнего введения ЦФ регистрируется заметное снижение количества основных субпопуляций лимфоцитов по сравнению с контрольной группой (рисунок). В частности, доля В-клеток (CD19⁺) снижается с 22±2 до 7±1,5% (p<0,05). Среди Т-клеток в наибольшей степени подвержены супрессивному действию ЦФ CD4⁺-лимфоциты, содержание которых снижается с 37±4 до 17±3 % (p<0,05). Введение ЦФ приводит также к достоверному уменьшению НК (DX5⁺) – с 12±2 до 3±0,1% (p<0,01). Наряду с изменением количества перечисленных клеток, отмечается также очевидная тенденция к снижению уровня НКГ (CD3⁺/DX5⁺) и Т-регуляторных клеток (CD4⁺/CD25⁺). CD8⁺-лимфоциты были в меньшей степени подвержены действию ЦФ. Восстановление исходных показателей иммунофенотипа в данных условиях регистрировалось на 5–7 сутки после последнего введения цитостатика. Воздействие Иммуновак ВП-4 приводило к нормализации основных изменений иммунного статуса, вызванных цитостатиком. Действительно, в группе мышей, получавших ВП-4 после введения ЦФ, уже на 2 сут. содержание CD19⁺-клеток составило 19±5%, а CD4⁺-лимфоцитов поднялось до 28±9%. Эти показатели достоверно не отличались от таковых в контрольной серии опытов. Иммуносупрессивное действие ЦФ проявлялось не только лимфопенией и изменением субпопуляционного состава лимфоцитов, но и в снижении функциональной активности НК. Уровень НК-активности МЛ селезенок мышей значительно уменьшался уже через сут. после введения ЦФ и полностью не восстанавливался даже к 5 сут. (табл. 2). Применение ВП-4 на фоне ЦФ приводило к достоверному увеличению киллерной активности МЛ, которая, однако, не достигала исходных значений. Таким образом, ЦФ (цитостатик, обычно используемый в экспериментальном моделировании индуцированной иммуносупрессии) наряду с характерной для его действия нейтропенией вызывает выраженную иммуносупрессию, которая проявляется значительным снижением абсолютного количества лимфоцитов в периферической крови и селезенке мышей.

Литература

1. Ахматова Н.К., Лебединская О.В., Киселевский М.В. и др. Влияние дендритных клеток, генерированных при помощи иммуномодуляторов... // ЖМЭИ. – 2005. – № 6. – С. 58–62.
2. Ахматова Н.К., Лебединская Е.А., Лебединская О.В. и др. Усиление цитотоксической активности мононуклеаров периферической крови... // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – № 3. – С. 52–3.
3. Alarok S., Salmi T.T., Pelliniemi T.T. Recovery of natural killer cells after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia and solid tumors // Med. Pediatr. Oncol. – 1995. – Vol. 24. – P. 373.
4. Azuma E., Nagai M., Qi J. et al. CD4⁺ T-lymphocytopenia in long-term survivors following intensive chemotherapy in childhood cancers // Med. Pediatr. Oncol. – 1998. – Vol. 30. – P. 40.
5. Bruserud O. Cellular immune responses in acute leukemia patients with severe chemotherapy-induced leucopenia characterization... // Cancer Immunol. Immunother. – 1998. – Vol. 46(4). – P. 221–8.
6. Bruserud O., Ulvestad E. Cytokine responsiveness of mitogen-activated T-cells derived from acute leukemia patients with chemotherapy-induced leucopenia // J. Interferon Cytokine Res. – 2000. – Vol. 20. – P. 947.
7. Goldman D. Chronic lymphocytic leukemia... // Clin. J. Oncol. Nurs. – 2000. – Vol. 4. – P. 233.
8. Kamani N., Kattamis A., Carroll A. et al. Immune reconstitution after autologous purged bone marrow transplantation in children // J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 2000. – Vol. 22. – P. 13.
9. Mackall C.L. T-cell immunodeficiency following cytotoxic... // Stem Cells. – 2000. – Vol. 18. – P. 10.
10. Mackall C.L., Fleisher T.A., Brown M.R. et al. Distinctions between CD8⁺ and CD4⁺ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy // Blood. – 1997. – Vol. 89. – P. 3700.
11. Ohnishi K., Yamanishi H., Naito K. et al. Reconstitution of peripheral blood lymphocyte subsets in the long-term disease-free survivors of patients with acute myeloblastic leukemia // Leukemia. – 1998. – Vol. 12. – P. 52.
12. Ozer H., Armitage J.O., Bennett C.L. et al. Update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines // J. Clin. Oncol. – 2000. – Vol. 18. – P. 3558.
13. Schirmer M., Hilbe W., Geisen F. et al. T-cells and natural killer cells after treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine // Acta Haematol. – 1997. – Vol. 97. – P. 180.
14. Sosman J.A., Stiff P., Moss S.M. et al. Pilot trial of interleukin-2 with granulocyte colony-stimulating factor for the mobilization... // J Clin Oncol. – 2001. – Vol. 19. – P. 634.
15. Yuk-Wah Tsang, Kwan-Hwa Chi, Che-Jeh Hu et al. Chemotherapy-induced immunosuppression is restored by a fermented soybean extract: a proof of concept clinical trial // Nutrition Research. – 2007. – Vol. 27. – P. 679–84.

УДК 616-006.484.04-092.9:615.831:615.849.19

К.В. Ермакова¹, И.Ю. Кубасова¹, Л.М. Борисова¹, М.П. Киселева¹, З.С. Смирнова¹, Г.А. Меерович³, Е.А. Коган⁴,
Е.А. Лукьянец², Г.Н. Ворожцов²

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ФОТОСЕНСОМ ГЛИОБЛАСТОМЫ 101/8 КРЫС¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва³ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва⁴ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, Москва**Контактная информация:**

Ермакова Ксения Викторовна, научный сотрудник лаборатории синтетических противоопухолевых веществ НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)-324-02-00

e-mail: erm82@mail.ru

Статья поступила 24.09.2009, принята к печати 23.10.2009.

Резюме

Изучение возможности применения ФДТ с использованием отечественного фотосенсибилизатора фотосенса при опухолях головного мозга является актуальным. При изучении уровня накопления фотосенса в динамике показано, что препарат дозозависимо и селективно накапливается в ткани глиобластомы 101/8. Установлено, что ФДТ следует проводить через 24 ч после введения фотосенса на 7 день после перевивки глиобластомы 101/8. Эффективность ФДТ с фотосенсом на глиобластоме 101/8 показана по патоморфозу опухоли после проведения лечения. При оценке патоморфоза через 72 ч после ФДТ отмечено выраженное повреждение опухоли: некроз и апоптоз опухолевых клеток, тромбоз и разрушение сосудов с обширными кровоизлияниями. После проведения ФДТ митозы в ткани глиобластомы 101/8 практически не определяются. Таким образом, показана возможность ФДТ с фотосенсом при лечении опухолей головного мозга.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, глиобластома 101/8, фотосенс, лазер.

K.V. Ermakova¹, I.Yu. Kubasova¹, L.M. Borisova¹, L.P. Kiseleva¹, Z.S. Smirnova¹, G.A. Meerovich³, E.A. Kogan⁴, E.A. Lukyanetz², G.N. Vorozhtsov²

THE EFFICIENCY OF PDT WITH A PHOTOSENSE GLIOBLASTOMA 101/8¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²State Research Center «NIOPIK», Moscow³Natural Sciences Center of A.M. Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow⁴I.M. Setchenov Moscow Medical Academy**Abstract**

The possibility of PDT application with the use of Russian photosensitizers for the brain tumors treatment is an actual problem. In this study we have shown that the drug selectively and dose-dependently accumulates in the glioblastoma 101/8 tissue. It is established that PDT should be carried out in 24 hours after the injection of Photosense on 7-th day of glioblastoma transplantation. The efficiency of PDT with a Photosense for a glioblastoma 101/8 was proved by a tumor pathomorphism. Estimated the pathomorphism 72 hours after PDT, we found the apparent damage of the tumor: necrosis and apoptosis of the tumor cells, thrombosis and destruction of the vessels with massive hemorrhage. After the PDT treatment the mitosis in the glioblastoma tissue is not determined. Thus, the possibility of PDT with a Photosense in the treatment of brain tumors is presented.

Key words: photodynamic therapy, glioblastoma 101/8, Photosense, laser.

Введение

В структуре смертности от онкологических заболеваний опухоли головного мозга составляют около 2 %, а заболеваемость продолжает расти. Так, в 2002 году в России было зарегистрировано 5320 новых случаев злокачественных опухолей головного мозга, при этом пророст заболеваемости по сравнению с 1993 годом составил 36 %.

Лечение злокачественных глиом головного мозга является одной из самых сложных задач в нейроонкологии. В настоящее время при лечении опухолей головного мозга применяется комбинированный метод, т.к. монотерапия не приводит к существенному улучшению непосредственных и отдаленных результатов. Комбинированное лечение включает хирургическое удаление опухоли, ЛТ и ХТ, а также новые методы лечения, такие как иммунотерапию и ФДТ [10].

Основной целью оперативного вмешательства является максимально полное удаление опухоли и гистологическая верификация диагноза. Удаление опухоли уменьшает количество неопластических клеток, что в ряде случаев трансформирует клеточную кинетику и обеспечивает повышение чувствительности клеток опухоли к химиотерапии. Кроме того, удаление опухоли приводит к снижению ВЧД, что влияет на качество жизни больного и выраженность неврологических проявлений болезни. Лучевая и химиотерапия применяются в основном в послеоперационном периоде.

Так, по данным See S.J. et al. [8] химиотерапевтическое лечение в сочетании с предварительным удалением опухоли и послеоперационной лучевой терапией позволяет повысить одно- и двухлетнюю выживаемость больных в основном с анапластическими астроцитомами.

В то же время мультиформные глиобластомы (МГ, глиомы IV степени злокачественности по МКБ ВОЗ) рецидивируют в 100 % случаев, чаще – в пределах 2 см от линии резекции [7], а продолжительность жизни таких больных не превышает 15 мес.

В последнее десятилетие широко исследуется новый метод лечения злокачественных опухолей головного мозга, основанный на селективном накоплении фотосенсибилизатора в опухолевых клетках и последующем облучении зоны поражения лазером с определенной длиной волны – ФДТ. Эффективность фотодинамического повреждения определяется уровнем и селективностью накопления сенсибилизатора в опухоли, его фотохимической активностью, а также плотностью мощности и световой дозой лазерного облучения. Кроме прямого цитотоксического действия ФДТ на опухолевые клетки, важную роль в деструкции злокачественного новообразования играют: нарушение кровоснабжения за счет повреждения эндотелия кровеносных сосудов опухолевой ткани, цитокиновые реакции, продукция фактора некроза опухоли и иммунологическая реакция, приводящая к активации макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов [9]. Показана эффективность ФДТ опухолей головного мозга с использованием как фотосенсибилизаторов фотолон, фотофрина, гематопорфирина, фоскана и некоторых других препаратов, в число которых входит Аласенс, являющийся предшественником эндогенного протопорфирина IX. При использовании интра- и послеоперационной ФДТ медиана выживаемости больных с МГ достигает 21 мес [11].

Цель работы – оценка возможности применения ФДТ с отечественным фотосенсибилизатором фотосенсом при лечении опухолей головного мозга, используя глиобластому 101/8 беспородных крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на половозрелых беспородных крысах массой 200–220 грамм. Глиобластома 101/8 была получена в феврале 1967 года на 186-й день после имплантации пилюли ДМБА в правое полушарие мозжечка крысы-самки линии Wistar. Глиобластому 101/8 (1–2 млн. клеток) подсаживали троакарком через трепанационное отверстие на глубину 3–4 мм в дно правого бокового желудочка.

Фотосенс, представляющий собой смесь натриевых солей сульфированного фталоцианина алюминия (от ди- до тетразамещенного), и синтезированный в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» использовали в виде р-ра для инъекций – 0,2% 50,0 мл. Препарат вводили однократно по 2 мг/кг; 3,5 мг/кг; 5,6 мг/кг и 10 мг/кг.

Изучение динамики уровня накопления ФС в опухолевой и здоровой ткани головного мозга в течение суток проводили на 7-й день после введения препарата внутривенно в хвостовую вену. Уровень накопления ФС в ткани ГМ и глиобластоме 101/8 крыс осуществляли спектрально-флюоресцентным методом с использованием спектроанализатора «ЛЭСА-01-БИОСПЕК». Возбуждение флюоресценции осуществлялось He-Ne лазером с длиной волны 632,8 нм. Концентрация фотосенсибилизатора выражалась в условных единицах и оценивалась по интегральной интенсивности его флюоресценции путем сравнения ее с интенсивностью флюоресценции эталонного фталоцианин-содержащего полимерного образца с известной концентрацией фталоцианина, сопоставимой с терапевтической концентрацией, и оптически характеристиками рассеивания, близкими к свойствам человеческих тканей. Селективность накопления ФС рассчитывали как соотношение между значе-

ниями интенсивности флюоресценции препарата в опухоли и в здоровой ткани ГМ.

Для проведения ФДТ крысам с глиобластомой 101/8 фотосенс вводили на 6–10 сут в хвостовую вену в дозах 2 мг/кг; 3,5 мг/кг и 5,6 мг/кг. Для предупреждения отека ГМ через 2 ч после облучения животным вводили дексаметазон по 1 мг/кг и далее ежедневно п/к в течение 3 дней. ФДТ проводили 2 способами: поверхностно через твердую мозговую оболочку, либо интерстициально с помощью специального световода, вводимого в полость черепа на глубину 1 мм через трепанационное отверстие. При облучении использовали лазер ЛФТ-630/670-01-БИОСПЕК в типичных параметрах облучения для работы с ФС: λ – 675 нм; величина мощности облучения и время воздействия варьировали, в зависимости от условий эксперимента (мощность облучения 55–250 мВт, время облучения 3–15 мин). Дозы ФС и режимы лазерного облучения см. в табл.

Для оценки эффективности использовали два критерия: увеличение продолжительности жизни опытных животных по сравнению с контрольными; патоморфоз опухоли после ФДТ.

УПЖ рассчитывали по формуле:

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

СПЖ_к – средняя продолжительность жизни крыс в контрольной группе, а СПЖ_о – в опытной группе.

При патоморфологическом исследовании крыс забивали путем декапитации через 72 ч и/или через 7 дней после лазерного облучения. Макроскопически оценивали размеры видимой опухоли. Затем делали срезы толщиной 6–8 микрон по общепринятой методике. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Фишера-Стьюдента с помощью пакета статистических программ «Statistica». Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Данные представлены в виде среднего \pm стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

На первом этапе мы исследовали динамику уровня и селективности накопления ФС в опухолевой ткани на 7-й день опыта с целью оценки времени начала проведения ФДТ. Изучение динамики уровня накопления проводили после в/в инфузии ФС по 10 мг/кг; 5,6 мг/кг и 3,5 мг/кг через 1; 3; 6; 12 и 24 ч.

При введении ФС по 10 мг/кг и 5,6 мг/кг мы наблюдали постоянный рост флюоресценции во времени с достижением максимального значения через 24 ч после введения препарата (7,22 усл. ед. и 4,88 усл. ед. соответственно). В здоровой же ткани головного мозга крыс уровень накопления ФС практически не изменялся в течение суток и составлял в среднем 0,3 усл. ед. и 0,2 усл. ед. соответственно. При введении препарата по 3,5 мг/кг максимальная интенсивность флюоресценции наблюдалась уже через 4 ч после введения препарата и составляла 3,93 усл. ед. Через 6 ч она несколько снижалась и оставалась на одном уровне (3,21–3,35 усл. ед.), тогда как в нормальной ткани ГМ уровень накопления ФС медленно снижался с 0,25 усл. ед. до 0,11 усл. ед. (рис. 1).

Исходя из полученных данных, можно сделать заключение, что ФС селективно накапливается в опухолевой ткани, и уровень накопления в дозе 3,5 мг/кг практически не отличается от такового в дозе 5,6 мг/кг через 3–4 ч после его введения.

Таблица

Фотодинамическая терапия глиобластомы 101/8 крыс

Опыт	Группа	ФС, мг/кг	Облучение			Животные	
			Плотность мощности*	t, мин	Способ	n **	День гибели
I	ФС+ облучение	5,6	250	15	Поверхн.	3/6	4 ч; 4 ч; 10 д
		5,6	250	5	Интерстиц.	2/6	4 ч; 10 д
II	ФС+ облучение	5,6	125	15	Поверхн.	3/6	4 ч; 4 ч; 4 ч
		5,6	125	5	Интерстиц.	2/6	4 ч; 12 д
III	ФС+ облучение	3,5	125	5	Интерстиц.	3/6	6; 7; 8 д
		—	125	5	Интерстиц.	2/6	4; 10 д
IV	ФС+ облучение	3,5	125	3	Интерстиц.	2/6	2; 2 д; 9 д
		3,5	55	6		2/6	
V	ФС+ облучение	3,5	100	5	Интерстиц.	2/7	2; 2 д; 9 д
		3,5	55	5		1/6	
VI	ФС+ облучение контроль	2	100	5	Интерстиц.	7/15*** 10/10	4 ч; 1; 2; 5; 8; 9 д
Без опухоли	ФС+ облучение	3,5	85	5	Поверхн.	1/2	4 ч
		3,5	55	5		0/3	

*При поверхностном излучении мВт/5мм², при интерстициальном – мВт

**в числителе – павшие крысы, в знаменателе – общее число крыс в группе

***в числителе – крысы, павшие на 19-й день эксперимента, в знаменателе – общее число крыс в группе

При патоморфологическом исследовании крыс забивали путем декапитации через 72 ч и/или через 7 дней после лазерного облучения. Макроскопически оценивали размеры видимой опухоли. Затем делали срезы толщиной 6–8 микрон по общепринятой методике. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Фишера-Стьюдента с помощью пакета статистических программ «Statistica». Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Данные представлены в виде среднего \pm стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

На первом этапе мы исследовали динамику уровня и селективности накопления фотосенса в опухолевой ткани на 7-й день опыта с целью оценки времени начала проведения ФДТ. Изучение динамики уровня накопления проводили после внутривенного введения препарата в дозах 10 мг/кг; 5,6 мг/кг и 3,5 мг/кг через 1; 3; 6; 12 и 24 ч.

При введении фотосенса в дозах 10 мг/кг и 5,6 мг/кг мы наблюдали постоянный рост флюоресценции во времени с достижением максимального значения через 24 ч после введения препарата (7,22 усл. ед. и 4,88 усл. ед. соответственно). В здоровой же ткани головного мозга крыс уровень накопления ФС практически не изменялся в течение суток и составлял в среднем 0,3 усл. ед. и 0,2 усл. ед. соответственно (рис. 1). При введении препарата в дозе 3,5 мг/кг максимальная интенсивность флюоресценции наблюдалась уже через 4 ч после введения препарата и составляла 3,93 усл. ед. Через 6 ч она несколько снижалась и оставалась на одном уровне (3,21–3,35 усл. ед.), тогда так в нормальной ткани головного мозга уровень накопления фотосенса медленно снижался с 0,25 усл. ед. до 0,11 усл. ед. (рис. 1).

Исходя из полученных данных, можно сделать заключение, что ФС селективно накапливается в опухолевой ткани, и уровень накопления препарата в дозе 3,5 мг/кг практически не отличается от такового в дозе 5,6 мг/кг через 3–4 ч после его введения.

При оценке селективности накопления фотосенса в опухолевой ткани показано, что индекс се-

лективности растет в течение суток. При введении препарата в дозах 10 мг/кг и 5,6 мг/кг это происходит главным образом вследствие повышения уровня накопления ФС в ткани глиобластомы 101/8, тогда как при введении ФС в дозе 3,5 мг/кг в основном за счет выведения препарата из нормальной ткани ГМ (рис. 2). Максимальный индекс селективности наблюдался при введении препарата в дозах 10 мг/кг и 5,6 мг/кг через 12 ч после введения фотосенса и составлял 12,7 и 12,4 соответственно, а в дозе 3,5 мг/кг на этот же срок наблюдения – 7,61, а через 24 ч – 7,8. Учитывая литературные данные о средней величине индекса селективности (7–8), и наши данные (7,8), по-видимому, ФДТ целесообразно проводить с использованием меньших доз фотосенса, когда наблюдается выведение фотосенсибилизатора из нормальной ткани ГМ, а индекс селективности остается высоким.

Таким образом, учитывая высокий уровень накопления фотосенса в глиобластоме 101/8 и снижение его в нормальной ткани мозга, лазерное облучение опухоли следует проводить через 24 ч после введения фотосенсибилизатора.

С целью определения срока начала проведения ФДТ, мы изучали динамику уровня накопления ФС в процессе роста глиобластомы 101/8 с 6 по 10 сутки после перевивки опухоли (рис. 3). ФС вводили в дозе 2 мг/кг. На рис. 3 видно, что уровень накопления фотосенса в опухолевой ткани ГМ через 24 ч после в/в введения препарата в дозе 2 мг/кг уже на 6-й день опыта составлял 1,7 усл. ед., а на 7-й день – 1,95 усл. ед. Далее уровень накопления ФС оставался на высоком уровне и к 9–10 дню опыта достигал 2,65–2,7 усл. ед., что, по-видимому, связано с ростом опухоли. Учитывая достаточный уровень накопления ФС, ФДТ можно проводить на 7-й день после перевивки опухоли.

При проведении ФДТ с ФС были изучены разные режимы лазерного облучения. Данные, представленные в табл. 1, показывают, что изученные режимы лазерного облучения опухолей при дозах ФС 3,5 мг/кг и 5,6 мг/кг вызывали гибель большинства леченных крыс от отека ГМ в первые часы после ФДТ или раньше контрольных животных, по-видимому, в связи с проявлением темновой токсичности.

Однако следует отметить, что при использовании фотосенса в дозе 3,5 мг/кг и интерстициальном лазерном облучении с мощностью 55 мВт в течение 5 мин погибло всего одно животное от развившегося отека ГМ.

При снижении дозы ФС до 2 мг/кг и изменении режима лазерного облучения (мощность 100 мВт, время облучения 5 мин) все же удалось выявить эффективность терапии по выживаемости (см. таблицу). На 19-й день эксперимента 7 из 15 крыс были живы после проведения ФДТ. В то же время в контроле к этому сроку наблюдения из-за развития опухолевого процесса выявлена 100% гибель животных.

Учитывая высокий процент гибели животных после облучения из-за развития отека ГМ, более надежным критерием оценки эффективности фотосенса при проведении ФДТ глиобластомы 101/8 следует считать патоморфологический критерий.

Нами установлено, что в опытной группе площадь некроза выше (до 70–90 %), чем в контрольной (10–15 %). Отмечалось резкое снижение количества митозов и повышалась выраженность апоптоза в опухолевой ткани после облучения, возрастало количество разрушенных сосудов с кровоизлияниями, а также их тромбоз в результате деструктивного васкулита. Кроме того, в опытной группе выявлены более выраженные повреждения прилежащей к опухоли ткани мозга, в связи с инфильтрацией ее опухолевыми клетками.

На рис. 4 представлены микрофотографии опухоли крысы из контрольной группы на 13-й день эксперимента. Опухоль растет в глубине мозговой ткани, построена из низкодифференцированных атипичных клеток веретеновидной формы с гиперхромными ядрами, большим количеством митозов, многочисленными тонкостенными сосудами капиллярного типа с пролиферацией эндотелия и перicyтов. Встречались множественные очаги спонтанного коагуляционного некроза, окруженные валом радиально расположенных опухолевых клеток, а также отдельные апоптотические тельца, расположенные преимущественно по периферии очагов некроза. Наблюдалась инвазия в прилежащую ткань мозга, где отмечались выраженные явления отека.

На рис. 5 представлены микрофотографии опухоли крысы опытной группы через 72 ч после ФДТ с параметрами облучения: плотность мощности 50 мВт/5 мм² в течение 5 мин. Опухоль построена из низкодифференцированных атипичных клеток веретеновидной формы с гиперхромными ядрами, митозы практически не определялись, но содержала многочисленные тонкостенные сосуды капиллярного типа с разрушенной базальной мембраной, сладжированием эритроцитов, тромбозом и диапезезом эритроцитов и формированием более крупных кровоизлияний. Встречались множественные очаги спонтанного коагуляционного некроза, и относительная площадь некроза в среднем составляла 70 % площади опухоли. Вокруг очагов некроза располагались в большом количестве апоптотические тельца. В зоне инвазии опухоли в прилежащую ткань мозга наблюдались отдельные поля некроза и кровоизлияний, а также выраженные явления отека окружающей опухоль ткани мозга.

В настоящее время излечение больных со злокачественными глиомами практически невозможно, несмотря на применение традиционных методов лечения. Хирургическое вмешательство помогает удалить основную массу опухолевой ткани, установить окончательный гистологический диагноз, а также снизить повышенное внутричерепное давление. ЛТ и ХТ не оказывают существенного влияния на продол-

жительность жизни пациентов. Поисками и внедрением в практическую медицину новых методов лечения опухолей ГМ занимается большое количество исследователей – как в эксперименте, так и в клинике [3].

Целью настоящего исследования являлось оценить возможность применения ФДТ с использованием отечественного фотосенсибилизатора II поколения – ФС.

Для исследования противоопухолевой активности ФДТ с использованием ФС нами выбрана глиобластома 101/8, которая близка по гистологическому строению мультиформной глиобластоме человека. Эта опухоль обладает высокой степенью прививаемости (90–100 %) и высокой инфильтративной способностью.

ФДТ является локальным методом лечения и эффект ее зависит от высокого уровня накопления и селективности фотосенсибилизатора в опухоли. При высокой селективности можно ожидать значительного поражения опухолевой ткани без или с минимальным повреждением нормальной ткани мозга, окружающей первичный очаг. На модели 9L-глиосаркомы крыс, леченных фотофрином-2, селективностью составила 8:1 [4]. Исследования с производными бензопорфирина выявили селективность, равную 7:1 при интракраниальных опухолях с максимумом накопления фотосенсибилизаторов в глиоме между 3 и 5 ч [5]. Как и при использовании в качестве сенсibilизаторов гематопорфирина и фотофрина, нами выявлена высокая селективность накопления ФС в опухолевой ткани. При оценке селективности накопления фотосенса в глиобластоме показано, что индекс селективности растет в течение суток и достигает 12,7; 12,4 и 7,8 при использовании препарата в дозах 10; 5,6 и 3,5 мг/кг соответственно.

Опухоли головного мозга отличаются от новообразований другого происхождения рядом специфических черт. Особенностью опухолей головного мозга является их рост в закрытом пространстве черепной коробки, поэтому небольшой массы опухоли достаточно для появления тяжелых неврологических симптомов. Поэтому большинство лечебных воздействий, в том числе и оперативное вмешательство, вызывают развитие отека мозга, который нередко приводит к декомпенсации неврологических расстройств и летальному исходу. Еще одной особенностью является отсутствие в мозге лимфатической системы. Накапливающаяся в опухоли и окружающей отечной ткани мозга жидкость не может быть удалена иначе, как при помощи диффузии к ликвороносным пространствам, что в значительной степени усиливает выраженность отека. Кроме того, развитию отека способствует повышение давления в капиллярном русле опухоли, вследствие недостаточной микроциркуляции и тромбоза сосудов. Послеоперационный отек ГМ описывается во многих экспериментальных и клинических исследованиях. Многие исследователи считают, что отек головного мозга можно легко контролировать при помощи глюкокортикоидной терапии, тогда как другие исследователи отмечают, что кортикостероиды не влияют на степень развития отека ГМ. При комбинированном лечении с включением интра- и послеоперационной ФДТ, явления отека мозга могут прогрессировать. Рядом ученых [6] установлено, что у больных после удаления опухоли и последующей ФДТ внутричерепное давление в первые 24–36 ч после операции было в 2 раза выше, чем у пациентов только после резекции опухоли. В клиническом исследовании Eljamel M.S. [2] показано, что после внутриполостной ФДТ опухоли без декомпрессии отек ГМ развивался у всех пациентов и достигал максимума между 24 и 72 ч после ФДТ.

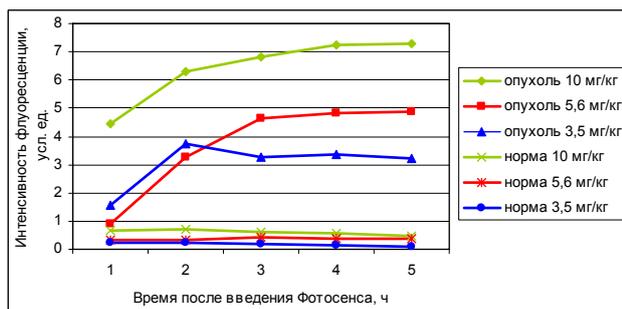


Рис. 1. Динамика интенсивности флюоресценции фотосенса в ткани глиобластомы 101/8 и нормальной ткани мозга крыс в течение суток после введения препарата в дозах 10 мг/кг; 5,6 мг/кг; 3,5 мг/кг.

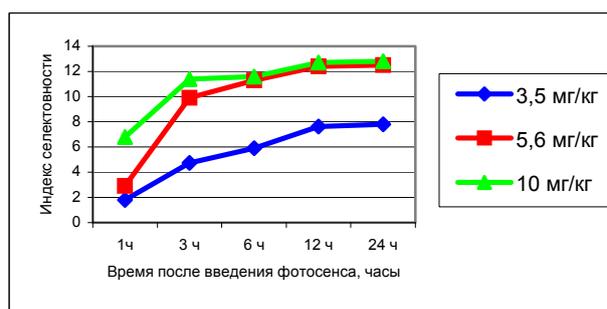


Рис. 2. Индекс селективности накопления фотосенса в ткани глиобластомы 101/8 в разных дозах в течение суток после введения препарата.

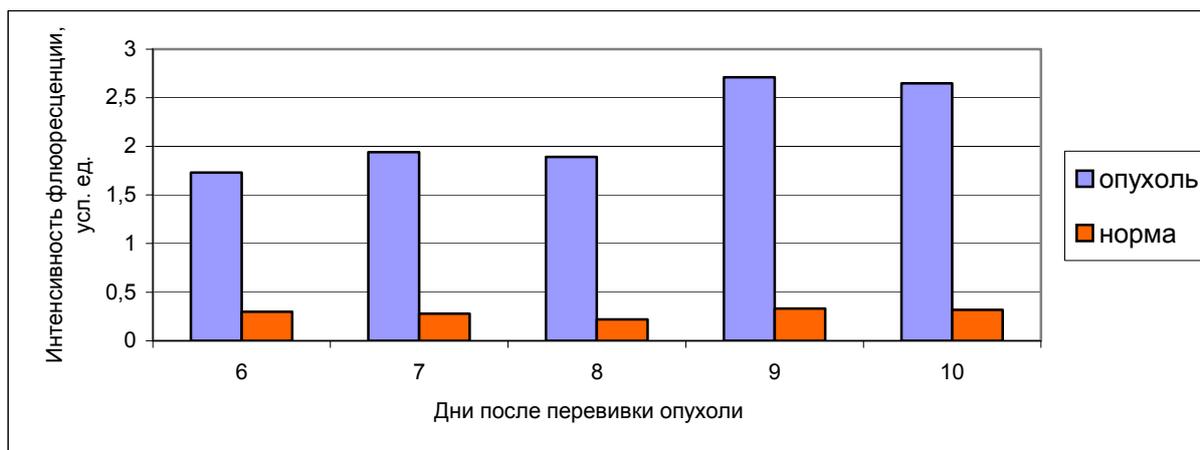


Рис. 3. Динамика интенсивности флюоресценции фотосенса в ткани глиобластомы 101/8 и нормальной ткани мозга крыс через 24 ч после введения препарата в дозе 2 мг/кг.

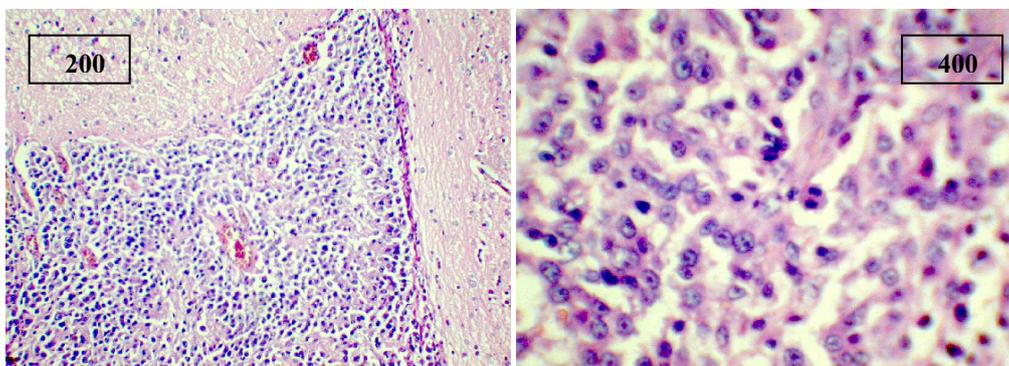


Рис. 4. Глиобластома 101/8. 13-й день опыта. Контрольная крыса. Окраска гематоксилин-эозином.

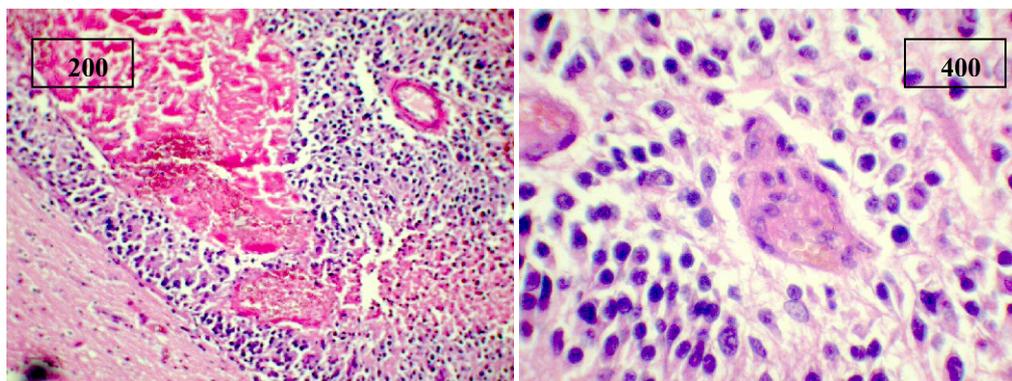


Рис. 5. Глиобластома 101/8. 13-й день опыта. Через 72 ч после ФДТ (50 мВт/5 мм²×5 мин). Окраска гематоксилин-эозином.

В нашем исследовании на крысах с глиобластомой 101/8 большинство животных после ФДТ с использованием высоких доз (3,5–5,6 мг/кг) фотосенса погибали в течение первых 3 дней после лазерного облучения от выраженного отека мозга.

На более поздних сроках (в течение недели) основными причинами гибели животных были внутримозговая гипертензия и кровоизлияния в области опухоли. При гистологическом исследовании мозга этих крыс был обнаружен некроз опухоли с многочисленными кровоизлияниями, а также отек окружающей ткани.

В то же время, нам все же удалось уменьшить побочные эффекты путем снижения дозы фотосенса (2 мг/кг), определенного режима лазерного облучения (100 мВт в течение 5 мин), а также введения глюкокортикоидов мы получили терапевтический эффект применения ФДТ и смогли оценить ее эффективность по критерию УПЖ (на 19-й день эксперимента 54 % опытных крыс были живы при 100% гибели контрольных животных).

Однако эти результаты УПЖ были статистически незначимы, поэтому более надежным критерием оценки эффективности ФДТ с использованием ФС считаем патоморфологический.

Наши результаты показывают четкую зависимость между дозой облучения и/или фотосенсибилизатора и объемом некроза в опухоли. Berenbaum M.C. et al. [1] обнаружили, что значительную роль в действии ФДТ играет накопление фотосенсибилизатора в эндотелиальных клетках.

Поэтому облучение сенсibilизированных эндотелиальных клеток приводит к поражению капилляров, обширным кровоизлияниям и таким образом к некрозу опухолевой ткани.

Кроме того, ФДТ сопровождается отеком ГМ, что приводит к снижению кровоснабжения опухоли и последующему некрозу.

Литература

1. *Berenbaum M.C., Hall G.W., Hoyes A.D.* Cerebral photosensitisation by haematoporphyrin derivative. Evidence for an endothelial site of action // *Br J Cancer.* – 1986. – Vol. 53(1). – P. 81–9.
2. *Eljamel M.S.* Brain photodignosis (PD), fluorescence guided resection (FGR) and photodynamic therapy (PDT): past, present and future // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2008. – Vol. 5(1). – P. 29–35.
3. *Gaullier J.M., Berg K., Peng Q. et al.* Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57(8). – P. 1481–6.
4. *Gupta S., Dwarakanath B.S., Muralidhar K., Jain V.* Cellular uptake, localization and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in human glioma and squamous carcinoma cell lines // *J Photochem Photobiol B.* – 2003. – Vol. 69(2). – P. 107–20.
5. *Hebeda K.M., Kamphorst W., Sterenborg H.J., Wolbers J.G.* Damage to tumour and brain by interstitial photodynamic therapy in the 9L rat tumour model comparing intravenous and intratumoral administration of the photosensitizer // *Acta Neurochir (Wien).* – 1998. – Vol. 140(5). – P. 495–501.
6. *Hebeda K.M., Saarnak A.E., Olivo M. et al.* 5-Aminolevulinic acid induced endogenous porphyrin fluorescence in 9L and C6 brain tumours and in the normal rat brain // *Acta Neurochir (Wien).* – 1998. – Vol. 140(5). – P. 503–12.
7. *Muller P.J., Wilson B.C.* Photodynamic therapy of brain tumors--a work in progress // *Lasers Surg Med.* – 2006. – Vol. 38(5). – P. 384–9.
8. *See S.J., Gilbert M.R.* Chemotherapy in adults with gliomas // *Ann Acad Med Singapore.* – 2007. – Vol. 36(5). – P. 364–6.
9. *Stylli S.S., Kaye A.H.* Photodynamic therapy of cerebral glioma--a review Part I--a biological basis // *J. Clin. Neurosci.* – 2006. – Vol. 3(6). – P. 615–25. Epub 2006 Mar 22.
10. *Yang L., Ng K.Y., Lillehei K.O.* Cell-mediated immunotherapy: a new approach to the treatment of malignant glioma // *Cancer Control.* – 2003. – Vol. 10(2). – P. 138–47.
11. *Zimmermann A., Ritsch-Marte M., Kostron H.* mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors // *Photochem. Photobiol.* – 2001. – Vol. 74(4). – P. 611–6.

Работа выполнена при поддержке правительства г. Москвы на основании научно-технической программы «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний».

Выводы

Полученные данные свидетельствуют, что фотосенс селективно и дозозависимо накапливается в опухолевой ткани. Индекс селективности растет в течение суток. Максимальный индекс селективности наблюдается при введении препарата по 10 мг/кг и 5,6 мг/кг через 12 ч после введения ФС и составляет 12,7 и 12,4 соответственно, а в дозе 3,5 мг/кг на этот же срок наблюдения – 7,61; через 24 часа – 7,8. Учитывая достаточно высокий уровень накопления ФС в ткани глиобластомы 101/8, ФДТ следует проводить на 7-й день опыта и через 24 ч после введения фотосенсибилизатора, когда наблюдается выведение фотосенсибилизатора из нормальной ткани ГМ, а индекс селективности остается высоким. Выявлена эффективность ФДТ с ФС по критерию увеличения продолжительности жизни только при введении ФС в дозе 2 мг/кг и щадящем режиме лазерного облучения (100 мВт в течение 5 мин). На 19-й день эксперимента в опытной группе 7 из 15 крыс остаются живы, тогда как в контроле наблюдается 100% гибели животных. Основным критерием эффективности ФДТ+ФС – патоморфологический. При оценке патоморфоза через 72 ч после ФДТ отмечено выраженное повреждение опухоли: некроз и апоптоз неопластических клеток, тромбоз и разрушение сосудов с обширными кровоизлияниями. Таким образом, в результате проведенного нами исследования показана эффективность ФДТ с ФС по патоморфозу глиобластомы 101/8 в процессе лечения и, следовательно, возможность испытания отечественного фотосенсибилизатора II поколения при лечении опухолей ГМ в клинике. Для уменьшения побочных явлений (отек ГМ) необходимо продолжить исследование с целью подбора терапевтической дозы ФС и световой дозы лазерного облучения, чтобы минимизировать побочные эффекты ФДТ.

ОБЗОРЫ

УДК616.24–006.6–053.5

*Р.Р. Багиров, Б.Е Полоцкий***РАК ЛЕГКОГО У БОЛЬНЫХ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Багиров Рахмат Рагим оглы, аспирант хирургического торакального отделения

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-14-41**e-mail:** zahid28@yandex.ru

Статья поступила 29.09.2009, принята к печати 23.10.2009.

Резюме

Заболеваемость раком легкого лиц молодого возраста сдвинута в сторону молодых женщин, а преобладающим гистологическим типом является аденокарцинома, зачастую низкой степенью дифференцировки. Как у больных старших возрастных групп, так и у пациентов молодого возраста результаты радикального хирургического или комбинированного лечения во многом зависят от внутригрудного лимфогенного метастазирования. Учитывая архитектуру лимфатической системы у молодых, лимфогенное метастазирование в этой группе больных реализуется в более ранние сроки. Результаты радикального хирургического или комбинированного лечения у пациентов молодого возраста при сравнимой распространенности опухолевого процесса не уступают таковым у больных старших возрастных групп.

Ключевые слова: рак легкого, молодой возраст, прогноз.*R.R. Bagirov, B.E. Polockiy***LUNG CANCER IN YOUNG PATIENTS**

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

Abstract

Morbidity of lung cancer of young age is moved toward young women. A prevailing histological type is adenocarcinoma. Both for the patients of more senior age-dependent groups and for the patients of young age the results of radical surgical or combined treatment in a great deal depend on intrathoracic distribution of lymphogenic metastases. Taking into account architectonics of the lymphatic system for youths, a lymphogenic innidiation in this group of patients will be realized in more early terms. The results of radical surgical or combined treatment of lung cancer for the patients of young age at the compared prevalence of tumour process do not yield to such at more senior age-dependent groups.

Key words: lung cancer, young age, prognosis.**Введение**

Рак легкого чаще диагностируется в возрасте 50-80 лет, составляя в молодом возрасте всего 9-14% [21; 47; 51]. Несмотря на многочисленные публикации, в литературе остаются различия представлений о клиническом течении заболевания и результатах лечения в разных возрастных группах.

Поэтому представляет интерес сравнительная оценка особенностей лимфогенного метастазирования и результатов хирургического лечения НМРЛ у больных молодого, среднего и пожилого возраста.

Заболеваемость РЛ лиц молодого возраста

В своей трактовке молодого возраста мы основывались на классификации ВОЗ (1978) [10], по которой приняты следующие характеристики различных возрастных периодов на протяжении жизни человека:

- 46–59 – средний возраст;
- 60–74 – пожилой возраст;
- 75 – старческий возраст.

В приведенной классификации не приводится возрастной период для людей молодого возраста, но что важно, указан возрастной период для людей среднего возраста, а это с учетом данных литературы позволяет сформировать группу лиц молодого возраста – до 46 лет.

В возрасте до 30 лет рак легкого наблюдается еще реже, хотя известны казуистические случаи детей у даже раннего возраста. Так Вагнер Р.И. с соавт. [1] наблюдали (1987) первичный рак легкого у девочки в возрасте 22 месяцев. В 1976 г. L.J. Fontenelle [19] сообщил о редком случае аденокарциномы нижней доли правого легкого у ребенка 6 лет. Согласно данным (1999) группы Y. Emori [59] заболеваемость раком легкого в возрасте до 30 лет колеблется в пределах 0,1–0,4%. У лиц до 45 лет это заболевание встречается сравнительно редко (2,2–30,0 %) [5; 6; 11; 13; 19; 22; 26; 32; 34; 39; 40; 44; 49; 51; 53; 59], что приводит к запоздалому распознаванию и частым диагностическим ошибкам. Вместе с тем, пациенты этой возрастной группы – наиболее активная часть трудоспособного населения, и абсолютное их число увеличивается ввиду общей тенденции к росту заболеваемости РЛ.

Существует мнение, что у женщин заболевание раком легкого сдвинуто в сторону более молодого возраста по сравнению с мужчинами. По данным В.Ф. Зайцева (1989), из числа зарегистрированных в 1987 г. в бывшей Молдавской ССР больных раком легкого на молодой возраст приходилось 3,8%. Этот показатель был выше у молодых женщин – 7,9%, чем у мужчин – 4,1% [5].

De Caro L. et al. [17] сообщили (1982), что соотношение М : Ж среди молодых больных РЛ составило 1,5 : 1, в группе старше 45 лет – 6 : 1.

Kuo CW. et al. [29] на Тайване (2000) также приводят аналогичные данные соотношения мужчин и женщин в молодой, средней и пожилой возрастных группах: 0,89; 4,59; 6,66 соответственно.

Jennifer B.T. et al. [28] в США (2005) проанализировав течение рака легкого у 228 572 больных, показав что в возрасте до 50 лет относительно пациентов более старшего возраста преобладают женщины, составляя 35,8%. Авторы отмечают, что если до 1991 г. уровень женского населения подошел к пику заболеваемости 33,1 на 100 000 человек, то в 1992–1999 гг. этот показатель снизился до 30,2 на 100 000 человек. Поэтому «мужское и женское» соотношение с 1975 по 1999 значительно – с 3,5 до 1,5 – сузилось. По данным авторов общая выживаемость в группах сравнимой распространенности болезни оказалась лучше у женщин.

О преобладании относительно старших возрастных групп заболеваний раком легкого молодых женщин также опубликовано в работах многих авторов [14–16; 23; 28; 34; 38; 39; 47; 52; 53; 56; 57].

Лимфогенное внутригрудное метастазирование РЛ у больных молодого возраста

Имеется небольшое число публикаций, касающихся характера метастазирования рака легкого у молодых пациентов [3; 5–7; 21; 56] хотя общие закономерности внутригрудного и отдаленного метастазирования рака легкого хорошо изучены.

Одним из факторов, оказывающих несомненное влияние на характер метастазирования рака легкого у больных молодого возраста, является отсутствие изолированности лимфатической системы отдельных участков легких, которая наблюдается в возрасте старше 40–45 лет [3; 7–9; 12; 25].

J.D. Harviel et al. [25]; Becker H. et al. [12] отмечают, что у пожилых метастазирование в регионарные лимфатические узлы наблюдается реже, с возрастом наступают выраженная редукция лимфатических сосудов, уменьшение их территориальной сети, цирротические изменения паренхимы легкого.

Каримов О.Р. [6] выявил в своих работах, что РЛ у молодых пациентов характеризуется ранним и обширным метастазированием. Так, частота внутригрудного регионарного метастазирования составила 55,3%. Также автор отмечает более агрессивное поведение плоскоклеточного РЛ у молодых: частота регионарного метастазирования составила 55,6%; при аденокарциноме – 36,5% ($p < 0,05$).

По данным В.Ф. Зайцева [5], анализировавшего результаты хирургического лечения у 300 больных различных возрастных групп, метастазирование в регионарные лимфатические узлы у молодых выявлено в 50,3%; у пожилых – в 38,5% случаев ($p < 0,05$). В молодом возрасте преобладало поражение внутригрудных лимфатических узлов (48,0%), у – пожилых 23,9%.

В то же время в литературе последнего десятилетия [21; 23] у молодых пациентов не отмечено

достоверных различий в частоте внутригрудного метастазирования при сравнении с больными старших возрастных групп.

Как при центральном, так и при периферическом раке легкого наиболее значимым прогностическим фактором, определяющим высокий метастатический потенциал, является размер опухоли.

Приведенные данные О.Р. Каримова [6], а также немногочисленные источники литературы [56] утверждают, что опухоли размерами до 3,0 см во всех возрастных группах больных характеризуются одинаково низким метастатическим потенциалом. Так, при размере первичного опухолевого очага до 1,0 см частота лимфогенного метастазирования составила 26,5%; 3,0–5,0 см и выше – 50,0%. Увеличение размера опухоли у больных молодого возраста определяет высокий метастатический потенциал в связи с архитектурой лимфатической системы этой группы пациентов [3; 7–9; 12; 25].

Хирургия РЛ у больных молодого возраста

Вопрос о хирургическом лечении рака легкого у больных молодого возраста освещен недостаточно полно и весьма противоречиво. Это, скорее всего, связано с редкостью заболевания в этой группе пациентов. Во многих публикациях, в основном, в 1973–1992 гг. имеются данные [2; 13; 17; 22; 42; 55] о низких результатах хирургического лечения у молодых относительно больных старших возрастных групп. В то же время другие авторы показывают одинаковые, и даже лучшие результаты хирургического лечения у молодых пациентов [14; 18; 29; 30; 32; 36; 38; 39; 41; 48; 51; 52]. Основываясь на неудовлетворительных результатах хирургического лечения рака легкого у больных молодого возраста, некоторые авторы [44; 58] делают вывод о нецелесообразности оперативного лечения в этой возрастной группе и рекомендуют ограничиваться химиолучевой терапией.

Подробно в отечественной литературе данный вопрос освещен Зайцевым В.Ф. и соавт., [5], которые показали, что возможность выполнения радикальной операции среди госпитализированных у пожилых составили 77,2, у молодых – всего 40,3%. Резектабельность составила 92,2 и 84,0% соответственно. Консервативная терапия рака легкого у больных молодого возраста малоэффективна, однако авторы также отмечают, что показатель 5-летней выживаемости после радикального хирургического или комбинированного лечения рака легкого у молодых достоверно не уступают таковым у пожилых больных, составляя 32,1 и 38,3% соответственно. В обеих возрастных группах лучшие результаты лечения получены при высокодифференцированной аденокарциноме: 5-летняя выживаемость молодых составила 61,5; пожилых – 43,6%.

Аналогичного мнения придерживаются, изучив клинические особенности, частоту разных гистологических типов в зависимости от пола и возраста среди 930 наблюдений первичного РЛ, Da-Li Tian. et al. [18]. Молодую группу составляли 92 (9,89%) пациента. Плоскоклеточный рак среди них встречался в 37,0% наблюдений, аденокарцинома – в 33,0%, МРЛ – в 28,0% и крупноклеточный – в 2,0% случаев. Частота I и II и III стадий РЛ у молодых больных составила 32,6; 32,6 и 34,8% соответственно; в 62,0% случаев им выполнены радикальные вмешательства, а у 30,0% в связи с местным распространением процесса операции признаны условно-радикальными. Пневмонэктомии в этой группе выполнялись значительно чаще при сравнении с больными старшей возрастной группы – 59 и 39% соответственно.

5-летняя выживаемость молодых (при I–III стадиях болезни составляя 63,0; 53,0; 22,0% соответственно) относительно больных старших возрастных групп оказалась выше (46,0; 34,0 и 18,0% соответственно). Однако разница оказалась статистически недостоверной ($p > 0,05$). Ни один молодой пациент, получивший химиолучевую терапию, без хирургического лечения не пережил 5-летний срок.

Лучшую 5-летнюю выживаемость у молодых пациентов также отмечают Niroya Minami. et al. [35], исключив все смертельные случаи от сопутствующих заболеваний у пожилых пациентов, пришли к выводу, что результаты хирургического лечения при I стадии болезни у молодых по сравнению с пожилыми пациентами несколько лучше, составляя 84,3 и 71,6% соответственно. Однако различия статистически не достигли достоверности. Общая 5-летняя выживаемость в обеих возрастных группах также достоверно не различалась, составляя 61,0 и 57,7% соответственно. Авторы также отмечают преобладание у больных молодого возраста аденокарциномы.

Shimono T. et al. [52], проведя сравнительный анализ данных о 803 больных НМРЛ, показали, что молодую группу с I стадией заболевания составили 29,0%; со II – 17,0%, с III – 54,0%. В старшей возрастной группе III стадия выявлена в 46,0% наблюдений. 5-летняя выживаемость при I; II; III и IV стадиях у молодых относительно больных пожилого возраста составила 35,7 и 78,0%; 25,5 и 40,6%; 33,3 и 15,6%; 25,0 и 6,6% соответственно. Лучшие показатели выживаемости при III стадии болезни у молодых связывают с возможностью проведения более агрессивного хирургического и консервативного лечения.

Kuo C.W. et al. [29] сообщают о результатах сравнительного анализа данных о 6048 больных НМРЛ разных возрастных групп на Тайване. Из общего числа наблюдений только 127 (2,1%) пациентов составили молодую, а 5921 (97,9%) – старшую группу. По сравнению с последней частота аденокарциномы оказалась больше в молодой группе (60,6 и 34,2% соответственно), а плоскоклеточного рака (20,5 и 44,6% соответственно) – больше в пожилой. Частота I; II и III стадии болезни в обеих возрастных группах не имели существенного различия: 9,4 и 15,1% при I; 4,7 и 3,6% при II; 29,9 и 35,0% при III; 46,5 и 39,9% при IV стадии соответственно. Хирургическое и комбинированное лечение одинаково часто выполнялись во всех возрастных группах – 14,2%; 10,3% и 10,2% и 26,8%; 20,6% и 20,2% соответственно. Выживаемость радикально оперированных молодых оказалась недостоверно несколько лучше – 21,0 и 16,0% соответственно.

Аналогичные данные приводят Skarin AT. et al. [53], отмечая низкую частоту I и II (15%), и высокую частоту III и IV стадии болезни у молодых пациентов. Общая 5-летняя выживаемость в зависимости от стадии не различалась у молодых и более зрелых больных.

Jennifer B.T. et al. [28] сообщают о лучшей 5-летней выживаемости молодых женщин после хирургического лечения. Они чаще перенесли оперативное вмешательство и результаты хирургического лечения при сравнимой распространенности болезни оказалась лучше чем у молодых мужчин ($p = 0,0001$).

В многочисленных публикациях приводятся данные о том, что в молодом возрасте операции выполняются при достоверно большей распространенности опухолей, когда компенсаторные возможности пациентов позволяют выполнять хирургические вмешательства значительного объема, в том числе – пневмонэктомию, комбинированные с резекцией

нескольких пораженных опухолью прилежащих анатомических образований и расширенные на путях лимфооттока. Именно молодым чаще назначается дополнительная ЛТ и ХТ [2; 29; 41].

В более ранней литературе ряд авторов отмечали, что пневмонэктомию при РЛ у молодых должна быть доминирующей в радикальном хирургическом лечении. О.Р. Каримов [6], анализируя результаты хирургического и комбинированного лечения 182 больных молодого возраста, считает, что наиболее эффективным и рациональным методом лечения больных до 40 лет хирургический, причем операцией выбора является пневмонэктомию. Хорошие функциональные и компенсаторные резервы молодого организма, оправдывают комбинированные резекции. Лобэктомию и бронхопластические операции возможны при I–II стадиях болезни без метастазов во внутригрудные лимфатические узлы. Непосредственные результаты хирургического лечения РЛ у молодых лучше. Автор считает, что прогноз рака легкого у молодых в первую очередь зависит от стадии заболевания. Результаты хирургического лечения лучше при плоскоклеточном раке.

В 2005 году в результате проведенного сравнительного анализа результатов лечения больных раком легкого трех возрастных групп в РОНЦ [4], авторы пришли к выводу, что в молодом возрасте чаще операции выполнялись при местно распространенных поражениях, соответствовавших III (A+B) стадии. Поэтому в этой возрастной группе, сравнительно с другими, чаще выполнялись пневмонэктомию (57,1; 53,3 и 36,2% соответственно $p < 0,001$). Напротив, в пожилом возрасте больные чаще (79,4%) оперировались по поводу рака I–II стадии. В этой возрастной группе, сравнительно с остальными, чаще выполнялись лоб- и билобэктомию (38,8; 44,4 и 58,7% соответственно). Дополнительная лучевая и/или ХТ в плане комбинированного лечения назначалась, по данным 1990-х гг., преимущественно в молодом и среднем возрасте.

Воронцов А.Ю. с соавт. [2], изучив результаты хирургического и комбинированного лечения рака легкого у 196 больных молодого возраста отмечают, что результаты хирургического лечения низкие, так как из оперированных (85 человек) пациентов 5 лет прожили лишь 8 (10,0%).

Ряд авторов [2; 44; 58] считают, что проведение консервативного лечения без хирургического не позволяет молодым больным надеяться на благоприятный исход лечения. Так К. Krawczyk (1981) отмечает, что из 24 больных, получавших ХТ и ЛТ, ни один не прожил и года. По данным группы De Caro L. [17] из 23 больных, лечившихся без хирургического вмешательства, все умерли в течение первого года.

Guntulu A.K. et al. [23], оценив клиническое течение, результаты консервативного лечения при III стадии РЛ в обеих возрастных группах, не нашли достоверного различия, так как средняя выживаемость составляла $7,83 \pm 0,63$ мес. в группе молодых и $7,13 \pm 0,36$ мес. в группе пожилых ($p = 0,97$). В то же время после хирургического лечения при той же стадии показатели общей выживаемости у молодых пациентов оказались низкими и составили 11,5 и 21,8% соответственно.

Безусловно, результаты хирургического лечения рака легкого зависят от местной и регионарной распространенности опухоли. Одним из клинически значимых факторов является размер первичной опухоли. По данным О.Р. Каримова [6] и группы M.J. Veness [56] опухоли размерами до 3 см характеризовались лучшими отдаленными результатами хирургического лечения.

Показатели резектабельности у молодых больных по данным различных авторов 20-30 летней давности были на низком уровне. Так, P.A. Ganz et al. [20] отмечают, что в группе наблюдаемых больных молодой и старшей возрастной групп резектабельность составила 20,0 и 40,0% соответственно. У молодых пациентов в 40,0% случаев опухолевой процесс признан неоперабельным из-за местной распространенности, в 40 % – из-за наличия отдаленных метастазов. J.S. Putnam et al. [46] сообщают о низком уровне резектабельности (25,0%) у больных молодого возраста, так как из 24 пациентов молодого возраста оперативное вмешательство выполнено только 6, хотя у 18 пациентов до операции выявлены II и III стадии заболевания. Авторами также отмечена низкая общая выживаемость у молодых пациентов (медиана выживаемости 4,8 мес., у пожилых – 7,2 мес.). Аналогичные данные о низкой резектабельности подтверждены в исследовании J.G. Antkowiak et al. У 84 из 89 пациентов молодого возраста были выявлены III и IV стадии болезни, и только 19 (21,0%) удалось выполнить оперативное вмешательство. Однако медиана выживаемости была несколько выше (7,5 мес.) по сравнению с исследованием группы J.S. Putnam [46]. О.Р. Каримов [6] сообщает: резектабельность у молодых пациентов по отношению ко всем оперированным больным составил 64,1%, что ниже по сравнению со всей группой – 80,0%.

Операбельность молодых пациентов остается низкой и составляет среди всех обратившихся в клинику пациентов – от 2,8% до 4,5% [2; 15; 18; 52].

Разные сведения авторов, касающиеся общей выживаемости, можно объяснить разными подходами к интерпретации ряда прогностических факторов: стадия опухолевого процесса, гистопатология и подходы к лечению, которые были использованы в разных географических регионах. Также утверждается [4; 11; 21; 53; 56; 57], что большая частота прогрессирования опухолевого процесса у лиц молодого возраста лишь соответствует большей распространенности первичных опухолей на момент начала лечения и вовсе не отражает «более злокачественное» течение заболевания в молодом возрасте.

Приведенные литературные данные позволяют заключить: вопрос о хирургическом лечении и его результатах у молодых пациентов требует дальнейшего изучения.

Результаты и обсуждение

В исследование включены данные о 1727 больных, оперированных по поводу НМРЛ, в хирургическом торакальном отделении РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН в 1985–2007 гг.

Пациенты распределены по возрасту в соответствии с классификацией ВОЗ [10]:

- до 45 лет больные молодого (171 – 9,9%),
- от 46 до 59 лет среднего (888 – 51,4%)
- от 60 до 74 лет пожилого (668 – 38,7%)

Соотношение мужчин (1488 – 86,2%) и женщин (239 – 13,8%) составило 6,2 : 1 с преобладанием мужчин во всех возрастных группах. В группе пациентов молодого возраста было несколько больше женщин: соотношение полов составило 3,6 : 1 (78,3% против 21,6%).

Многие зарубежные исследователи сообщают о преобладании аденокарциномы у больных молодого возраста [13; 14; 28; 38; 51–53; 56; 57]. В нашем исследовании у молодых пациентов также

отмечено преобладание аденокарциномы, возрастание частоты плоскоклеточного рака с возрастом. Так, соотношение аденокарциномы и плоскоклеточного рака у больных молодого возраста составило 31,6% (54) : 62,6% (107) (1 : 1,98), среди пациентов среднего возраста 21,6% : 72,3%, (1:3,3) и пожилого 26,8% : 67,8% (1:2,5) (относительно больных среднего возраста разница статистически высоко достоверна $t=2,43$ $p<0,01$; относительно больных пожилого возраста $t=1,27$ $p<0,5$ – значимая тенденция к достоверности).

В возрастных группах каких-либо существенных различий плоскоклеточного рака разной степени дифференцировки мы не обнаружили. Однако при аденокарциноме в возрастных группах отмечена противоположная картина, так у молодых пациентов достоверно преобладала низкодифференцированная аденокарцинома, а в контрольных возрастных группах наиболее часто выявлена аденокарцинома высокой и умеренной степени дифференцировки. Так, высокодифференцированная аденокарциномы у больных молодого, среднего и пожилого возраста составила 3,7%; 4,2% и 4,5%; умеренно дифференцированная – 74,1%; 88,0% и 87,1%; низкодифференцированная – 22,2% (12); 7,8% (15) и 8,4% (15) ($t=2,41$ $p<0,02$) соответственно.

Таким образом, в структуре новообразований у молодых больных преобладает аденокарцинома, которая с достоверно чаще представлена опухолями с низкой степенью дифференцировки.

К моменту диагностики опухолевой процесс у больных молодого возраста имеет более распространенный характер [4–6; 15; 20; 21; 29; 41; 43; 46; 48]. По нашим данным I стадия заболевания достоверно чаще диагностирована у больных среднего и пожилого возраста – 29,6; 42,2 и 54,3% соответственно. В то же время у молодых пациентов чаще выявлялась IIIA стадия рака легкого – 33,1; 22,6 и 21,2% соответственно.

Одним из прогностически важных факторов, определяющих высокий метастатический потенциал и низкие показатели выживаемости, является размер первичной опухоли. У больных молодого возраста опухоли до 3,0 см одинаково с пациентами более старших возрастных групп характеризуются низким метастатическим потенциалом и относительно удовлетворительными результатами хирургического лечения [6; 56].

Наше исследование показало что, опухоли, соответствующие размерам от 3,0 до 5,0 см, с проксимальной границей на уровне долевого бронха являются отрицательными прогностическими клиническими факторами, определяющими повышенную частоту лимфогенного метастазирования и низкие показатели выживаемости у больных молодого возраста. Так, общая частота лимфогенного метастазирования в группе пациентов молодого возраста составила 66,7%, а старших возрастных групп 35,2 и 29,8% соответственно ($p<0,01$).

Радикальные и паллиативные операции во всех возрастных группах выполнялись с одинаковой частотой, однако в пожилом возрасте оперативные вмешательства реже завершались пробной торакотомией (9,9; 9,2 и 4,9% $p<0,05$) что, прежде всего, связано с отбором больных этой группы для лечения. Резектабельность в сравниваемых группах больных оказалась идентичной – 90,0; 90,7; 95,0% соответственно. В целом 5-летняя выживаемость молодых больных после радикального хирургического лечения ниже относительно пожилых – 34,2% против 43,3% ($p<0,05$).

Однако у молодых пациентов и в старших возрастных группах с I и II стадиями заболевания выживаемость одинакова, а ухудшается только при III стадии – 15,0; 28,8 и 22,1% ($p < 0,05$, $\chi^2 = 6,22$ $k=1$ Log-rank test) соответственно. Полученные нами данные не соответствовали данным некоторых зарубежных авторов. Так, в исследованиях групп Da-Li Tian (2003) и H. Minami (2001) при I и II стадиях рака легкого у больных молодого возраста относительно старшей возрастной группы отмечается лучшая 5-летняя выживаемость, а при III стадии рака легкого показатели 5-летней выживаемости фактически идентичны. В то же время в исследовании T. Shiono et al. [52] при I и II стадиях РЛ получена достоверно лучшая 5-летняя выживаемость больных старшей возрастной группы, а при III стадии – выживаемость оказалась гораздо лучше, чем у молодых пациентов.

При опухолях, соответствующих значению «Т₃» 3–5 см без учета лимфогенного метастазирования (N), выживаемость молодых пациентов также хуже чем в группе среднего и пожилого возраста и составила 33,1; 47,9 и 48,5% соответственно ($p < 0,01$, $\chi^2 = 10,5$ $k=1$ Log-rank test), что подтверждается данными некоторых исследователей [6; 56].

По сведениям одних авторов выживаемость при плоскоклеточном раке у молодых больных оказалась лучше [5], в то же время другие источники отражают лучшую выживаемость при аденокарциноме легкого [6].

По нашим данным, как при плоскоклеточном раке легкого, так и при аденокарциноме выживаемость в возрастных группах больных при I и II стадиях оказалась идентичной.

Однако при III стадии РЛ выживаемость больных аденокарциномой пациентов молодого возраста оказалась выше, а страдающих плоскоклеточным раком – ниже. Так, при аденокарциноме ОВ составила 41,0; 8,3 и 11,7% соответственно ($p < 0,02$ и $p < 0,05$), а при плоскоклеточном раке – 10,8; 30,0 и 30,3% соответственно ($p < 0,002$ и $p < 0,01$).

Однако на вопрос, что «связаны ли полученные нами данные с поведением опухоли» ответить трудно.

В заключении на основании данных литературы и собственных исследований следует отметить, что больным молодой возрастной группы необходимо активно расширять показания к оперативному лечению.

Литература

1. Вагнер Р.И., Шуткин В.А. Рак легкого у женщин. – Кишинев: Штиница, 1987. – 156 с.
2. Воронцов А.Ю., Терентьев И.Г. Первичный рак легкого у больных молодого возраста // Казанский медицинский журнал. – 2000. – Т.85. – С. 258–60.
3. Гладкова М.А. Метастазирование при раке легкого: автореф. дисс. канд. мед. наук. – М., 1966.
4. Давыдов М.И., Волков С.М., Полоцкий Б.Е. Возраст и возможности хирургического лечения при немелкоклеточном раке легкого. – Клиническая геронтология. – 2005. – Т.11, №6 – С. 4–5.
5. Зайцев В.Ф. Рак легкого у лиц молодого возраста. – Автореф. дисс. канд. мед. наук – Кишинев, 1989.
6. Каримов О.Р. – Рак легкого у больных в возрасте до 40 лет. – Автореф. дисс. кан. мед. наук, – М., 1990.
7. Парфенова И.П. Возрастные особенности лимфатической системы нормального легкого // Педиатрия. – 1953. – №1. – С.9 – 15.
8. Рабинович Э.Ф. Вопросы патологической анатомии и клиники лимфогенных фаз туберкулезного процесса. – М., «Медгиз», 1937. – С. 33.
9. Ротенберг А.Л. Лимфатическая система легких. – дисс. д-ра мед. наук. – Л., 1954.
10. Д.В. Чеботарев, Н.Д. Меньковский, В.В. Фрольский. – Руководство по геронтологии. – М., Медицина, 1978. – С. 371.
11. Awadh-Behbehani N., Al-Humood K., Ayed A., Memon A., Ali A. Comparison between young and old patients bronchogenic carcinoma // Acta Oncol. – 2000. – Vol. 8, №39. – P. 995–9.
12. Becker H., Wacha H., Blum U., Ungeheuer E. // Arch. Chir. – 1981. – Vol. 384, №4. – P. 299 – 304.
13. Bourke W., Milstein D., Giura R et al. Lung cancer in young adults // Chest. – 1992. – Vol.102. – P. 1723–9.
14. Capewell S., Wathen C.G., Sankaran R. Lung cancer in young patients // Respir Med. – 1992. – Vol. 86. – P. 499–502.
15. Chong-Kin L., Kim-Hatt L, Wong M.M. Lung cancer in patients younger than 40 years in a multiracial Asian country // Respiriology. – 2000. – Vol. 5. – P. 355–61.
16. Cornere M.M., Ferguson W., Kolbe J., Christmast T.I. Characteristics of patients with lung cancer under the age of 45 years: a case control study // Respiriology. – 2001. – Vol. 6, №4. – P. 293–6.
17. De Caro L., Benfield J.R. Lung cancer in young persons // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1983. – Vol. 86. – P. 654–8.
18. Da-li Tian, Hong-xu Liu, Lin Zhang, Hong-Nian Yin et al. Surgery for young patients with lung cancer // Lung Cancer. – 2003. – Vol. 42, №2. – P. 215–20.
19. Fontenelle L.J. Primary adenocarcinoma of lung in a child: review of the literature // Amer. Surg. – 1976. – Vol. 42, №4. – P. 296–9.
20. Ganz P.A., Vernon S.E., Preston D. Lung cancer in younger patients // West J. Med. – 1980. – Vol. 133. – P. 373–8.
21. Gadgeel S.M., Cummings G., Kraut M.J., Gaspar L.E., Kalemkerian G.P. Lung cancer in patients <50 years of age. The experience of an academic multidisciplinary program // Chest. – 1999. – Vol. 115. – P. 1232–6.
22. Green L.S., Fortoul T.L., Ponciano G., Robles C., Rivero O. Bronchogenic cancer in patients under 40 years old: the experience of a Latin American country // Chest. – 1993. – Vol. 104. – P. 1477–81.
23. Guntulu A.K., Metintas M., Metintas S. et al. Lung cancer in individuals less than 50 years of age // Lung. – 2007. – Vol.185. – P. 279–86.
24. Hadzic J.B., Secerov A., Zwitter M. Metastatic adenocarcinoma of the lung in a 27-year-old pregnantwoman // J. Thorac. Oncol. – 2007. – Vol. 2. – P. 450–2.

25. Harviel J.D., Mc Namara J.O., Strachley C.J. Surgical treatment of lung cancer in patients over the age of 70 years // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1978 – Vol. 75, №6. – P. 802–4.
26. Icard P., Regnard J.F., de Napoli S. Primary lung cancer in young patients: a study of 82 surgically treated patients // *Ann. Thorac. Surg.* – 1992. – Vol. 54. – P. 99–103.
27. Jubelier S.J., Wilson R.A. Lung cancer in patients younger than 40 years of age // *Cancer.* – 1991. – Vol. 67. – P. 1436–8.
28. Jennifer B.T. et al. Lung cancer in women // *Chest.* – 2005. – Vol. 127. – P. 768–77.
29. Kuo C.W., Chen Y.M., Chao J.Y. Non-small cell lung cancer in very young and very old patients // *Chest.* – 2000. – Vol. 117. – P. 354–7.
30. Kyriakos M., Webber B. Cancer of the lung in young men // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1974. – Vol. 67. – P. 634–48.
31. Kocak Z., Uzal M.C., Uygun K. Rising lung cancer deaths among younger individuals: Lung carcinoma in a patient at the age of 26 // *Onkologie.* – 2004. – Vol. 27. – P. 121.
32. Kreuzer M., Kreienbrock L., Gerken M. Risk factors for lung cancer in young adults // *J. Epidemiol.* – 1998. – Vol. 147. – P. 1028–37.
33. Leard P., Regnard J.F., de Napoli S., Roias-Miranda A. et al. Primary lung cancer in young patients: a study of 82 surgically treated patients // *Ann. Thorac. Surg.* – 1993. – Vol. 55, №3. – P. 809–10.
34. Mauri D., Pentheroudakis G., Bafaloukos D. et al. Non-small cell lung cancer in the young: a retrospective analysis of diagnosis, management and outcome data // *Anticancer Res.*, 26. – 2006. – P. 3175–81.
35. Minami H., Yoshimura M., Matsuoka H., Toshihiko S. Lung cancer treated surgically in patients <50 years of age // *Chest.* – 2001. – Vol. 120. – P. 32–6.
36. Minami H., Yoshimura M., Tsubota. Lung cancer in woman // *Chest.* – 2000. – Vol. 118. – P. 1603–9.
37. Maruyam R., Yoshino I., Yohena T. et al. Lung cancer in patients younger than 40 years of age // *J. Surg. Oncol.* – 2001. – Vol. 77. – P. 208–12.
38. McDuffie H.H., Klassen D.J., Dosman J.A. Female-male differences in patients with primary lung cancer // *Cancer.* – 1987. – Vol. 59. – P. 1825–30.
39. McDuffie H.H., Klassen D.J., Dosman J.A. Characteristics of patients primary lung cancer diagnosed at age 50 years or younger // *Chest.* – 1989. – Vol. 96. – P. 1298–301.
40. Mizushima Y., Yokoyama A., Ito M. et al. Lung carcinoma in patients age younger than 30 years // *Cancer.* – 1999. – Vol. 85. – P. 1730–3.
41. Nugent W.C., Edney M.T., Hammerness P.G. Non-small cell lung cancer at the extremes of age: impact on diagnosis and treatment // *Ann. Thorac. Surg.* – 1997. – Vol. 63. – P. 193–7.
42. Neuman H.W., McDonald J.R. Lung cancer in the young // *N. Engl. J. Med.* – 1956. – Vol. 212. – P. 403–8.
43. Neuman H.W., Ellis F.H. Bronchogenic carcinoma in persons under forty years of age // *N. Engl. J. Med.* – 1956. – Vol. 254. – P. 502–7.
44. Padilla J., Calvo V. Lung cancer in young adults // *Ann. Thorac. Surg.* – 1997. – Vol. 63. – P. 324–6.
45. Pemberton J.H., Nagorney D.M., Gilmore J.C. Bronchogenic carcinoma in patients younger than 40 years // *Ann. Thorac. Surg.* – 1983. – Vol. 36. – P. 509–15.
46. Putnam J.S. Lung cancer in young adults // *JAMA.* – 1977. – Vol. 238. – P. 35–6.
47. Radzikowska E., Roszkowski K., Glaz P. Lung cancer in patients under 50 years old // *J. Lung cancer.* – 2001. – Vol. 33, №2–3. – P. 203–1.
48. Roviario G.C., Varoli F., Zannini P., Fascianella A., Pezzuoli G. Lung cancer in the young // *Chest.* – 1985. – Vol. 87. – P. 456–9.
49. Rocha M.P., Fraire A.E., Guntupalli K.K., Greenberg S.D. Lung cancer in the young // *Cancer Detect Prev.* – 1994. – Vol. 18. – P. 349–355.
50. Robert J., Mathey P., Mermillod B., Egeli R.A. et al. Surgical resection of primary lung cancer. A 13-year experience // *Annales de Chirurgie.* – 1997. – Vol. 51, №7. – P. 682–8.
51. Ramalingam S., Pawlish K., Gadgeel S. Lung cancer in young patients: analysis of a surveillance, epidemiology, and results database // *J. Clin. Oncol.* – 1998. – Vol. 16. – P. 651–7.
52. Shimono T., Hayashi T., Kimura M., Yada I. et al. Surgical treatment of primary lung cancer in patients less than 40 years of age // *J. Clin. Oncol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 981–5.
53. Skarin A.T., Herbst R.S., Leong T.L., Bailev T.L., Sugarbaker D. Lung cancer in patients under age 40 // *J. Lung cancer.* – 2001. – Vol. 32, №3. – P. 255–64.
54. Sugio K., Ishida T., Kaneko S. Surgically resected lung cancer in young adults // *Ann. Thorac. Surg.* – 1992. – Vol. 53. – P. 127–31.
55. Tsai C.M., Perng R.P., Huang W.L. Lung cancer in young Chinese // *Cancer Detect Prev.* – 1988. – Vol. 11. – P. 235–8.
56. Veness M.J., Delanev G., Berry M. Lung cancer in patients aged 50 years and younger: clinical characteristics, treatment details and outcome // *Australas Radiol.* – 1999. – Vol. 43, №3. – P. 328–333.
57. Whooley B.P., Urschel J.D., Antkowiak J.G., Takita H. Bronchogenic carcinoma in patients age 30 and younger // *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2000. – Vol. 6. – P. 86–8.
58. Weiden P.L., Piantadosi S. Bronchogenic carcinoma in patients under age 40 // *Chest.* – 1994. – Vol. 106. – P. 344–7.
59. Yasuyuki Emori, Katsuyuki Kiura, Tadashi Yoshino. Very young patients with peculiar squamous cell carcinoma of the lung // *Internal Medicine.* – 1999. – Vol. 38, №12. – P. 268–73.

УДК 576.385.5:615.277.3.015.44

Н.А. Шаназаров¹, А.Х. Сабиров¹, С.М. Сироткина²**РОЛЬ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ЕГО РЕЦЕПТОРА В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ**¹ГОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия Росздрава»²ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет»,

ООО «Центр молекулярно-генетической диагностики Сабирова А.Х.»

Контактная информация:

Сабиров Ахат Халимович, доцент кафедры онкологии ТГМА

адрес: 625039, Тюмень, 50 лет Октября, 47/2; **тел.** +7(3452)-41-09-36, **моб.** +7(912)921-22-22**e-mail:** sabirov58@mail.ru

Статья поступила 18.05.2009, принята к печати 25.10.2009.

Резюме

В статье представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, дается описание структуры, функции и молекулярных механизмов действия эпидермального фактора роста и его рецептора в раковых клетках. Кроме того, в статье рассмотрена диагностическая и прогностическая значимость частоты выявления и определения уровней РЭФР при различных злокачественных новообразованиях.

Ключевые слова: эпидермальный фактор роста, таргетная терапия.N.A. Shanazarov¹, A.Kh. Sabirov¹, S.M. Sirotkina²**EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTOR PARTICIPATION IN CANCEROGENESIS: MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION**¹Tumen State Medical Academy,²Tumen State University

A. Kh. Sabirov Molecular and Genetic Diagnostic Center

Abstract

In this review we discuss the structure, function and molecular mechanisms of EGF and EGF-R action. Moreover in this MS we provide diagnostic and prognostic significance of EGF-R expression in tumor.

Key words: epidermal growth factor, target therapy.**Введение**

Благодаря молекулярно-генетическим исследованиям 1990-х гг. концепция происхождения и развития злокачественных новообразований к настоящему времени практически сформировалась.

Экспериментально доказано, что малигнизация клетки происходит вследствие накопления в ее ядерном аппарате различных генных аномалий в результате хромосомных перестроек, амплификаций, точечных мутаций и вирусной интеграции [4; 10; 12].

Несмотря на успехи фундаментальной онкологии, задача изучения диагностической и прогностической значимости частоты выявления и определения уровней РЭФР при различных злокачественных новообразованиях человека не решена.

Последний, наряду с другими онкогенами, супрессорными генами и секреторными белками, является перспективным маркером биологического поведения опухоли, позволяющим индивидуализировать терапию больным со злокачественными новообразованиями. ЭФР – потенциальная мишень новых схем противоопухолевой терапии, направленной на блокирование путей передачи митогенных сигналов в клетках [34].

Общая характеристика семейства РЭФР

Факторы роста и их рецепторы – молекулы, с которых начинается передача сигналов в клетке.

Большинство ныне описанных мембранных рецепторов являются протеинкиназами [7]. Протеинкиназы – ферменты, играющие ключевую роль в ряде процессов жизнедеятельности клетки: регуляция транскрипции, дифференцировки клеток, клеточного цикла, цитоскелетной организации, апоптоза, иммунного ответа. Одним из инициаторов исследования рецепторных протеинкиназ стал Стенли Кохен, впервые описавший ЭФР и ЭФР-рецептор. Ученые его группы установили, что интегральный мембранный белок «узнает» ростовой фактор и проявляет протеинкиназную активность [26; 27]. ЭФР – относительно низкомолекулярный полипептид ММ около 6 кДа, взаимодействующий с РЭФР на мембранах клеток. РЭФР – крупный трансмембранный гликопротеид ММ 170 кДа [37; 43]. Ген *egfr* РЭФР человека расположен на хромосоме 7p12.1–12.3. В большинстве типов клеток содержание РЭФР колеблется в пределах 2×10^4 – 2×10^5 рецепторов на клетку. Важно отметить, что если в опухоли обнаружена сверхэкспрессия РЭФР – больше 10^6 рецепторов на клетку, чаще всего прогноз неблагоприятен. В состав ЭФР-рецепторного семейства входят 4 белка: EGFR; HER2 (ErbB2, Neu); HER3 (ErbB3); HER4 (ErbB4) [6; 8; 9]. Различные названия рецепторов связаны с тем, что независимыми группами исследователей одновременно были открыты ген рецептора ростового фактора у человека (*her*), человеческий гомолог онкогена вируса эритробластомы птиц (*erbB*) и ген *neu*, который впервые выделен из клеток неоплазмы крысы.

Позже гомолог крысиного гена *neu* был найден в кДНК библиотеке человека. В результате секвенирования и последующего хромосомного картирования было установлено, что структуры генов *her2*, *erbB* и *neu* идентичны.

ЭФР-рецепторы имеют высокую степень гомологии и сходную структуру. В белке выделяют внеклеточный участок, в состав которого входят четыре субдомена – домен I (L1) и домен III (L2) опосредуют лигандное связывание, в то время как цистеинбогатые домены II (S1) и IV (S2) играют важную роль при димеризации рецепторов; внутриклеточный участок, который обладает тирозинкиназной активностью и играет критическую роль при запуске внутриклеточных путей передачи сигнала; трансмембранный участок, имеющий форму одноцепочечной спирали. Члены семейства могут формировать 4 гомодимера и 6 гетеродимеров устойчивой конформации.

Молекулярные механизмы действия ЭФР в опухолевых клетках

Экспрессия РЭФР физиологически необходима для нормальной и патологической клетки. В том случае, если ЭФР как лиганд связывается с РЭФР (или другим типом рецепторов) самой продуцирующей клетки, то такой механизм регуляции с участием ЭФР принято называть аутокринным, а если лиганд связывается с рецептором соседней клетки – паракринным [1; 3]. Аутокринный и паракринный механизмы [2; 5; 11; 14] регуляции пролиферации отличаются от эндокринного (регуляторный фактор (гормон) продуцируется, экскретируется специфическими железами в кровь и транспортируется к чувствительным клеткам, находящимся в органе-мишени, иногда весьма удаленном от места секреции).

Лиганды связываются с РЭФР в стехиометрическом соотношении 1:1, однако анализ методом Скэтчарда указывает на возможность наличия 2 типов экстраклеточных доменов РЭФР – с высоким ($K_d=1-3 \times 10^{-10}$ М) и низким ($K_d=2-15 \times 10^{-9}$ М) сродством к лигандам. Функциональное значение каждого из связывающих мест РЭФР пока четко не определено. Известно, что с РЭФР с высоким сродством связываются 7 лигандов: ЭФР; ТФР- α ; ЭФР-подобный, связанный с гепарином (НВ-EGF); амфирегулин; β -целлулин; эпирегулин и эпиген [13].

В том случае, если ЭФР связывается с рецепторами на поверхности мембраны, то ЭФР вызывает фосфорилирование белков либо непосредственно при взаимодействии с рецептором, являющимся тир-ПК-азой (ИФР-1, ИФР-2, инсулин), либо за счет включения аденилатциклазного или фосфатидилинозитольного каскадов и активации протеинкиназ. Фосфорилированные белки активируют транскрипционные факторы, вызывающие синтез мРНК и белков. В другом случае, ФР входит в клетку, в комплексе с внутриклеточным рецептором поступает в ядро, активируя транскрипцию генов, стимулирующих рост клетки. Гены, которые кодируют ФР (I), белки-рецепторы (II), трансдукторы сигналов (III) и транскрипционные факторы (IV), называют протоонкогенами. [23; 50].

Идентифицированы по крайней мере 3 сигнальные системы, которые активируются РЭФР, стимулируя прогрессию опухолевого процесса.

Во-первых, путь через фосфатидилинозитол-3-киназу, который приводит к активации белка Akt и, как следствие, к супрессии апоптоза (PI3K-Akt каскад).

Во-вторых, активация, по меньшей мере, 3 белков клеточного цикла, что стимулирует клеточный цикл.

В-третьих, фосфорилирование фосфолипазы C-1, который стимулирует перегруппировку молекул актина, что необходимо для клеточного цикла.

Кроме того, вероятно, семейство интерферонов может регулировать экспрессию самого РЭФР, причем это, видимо, связано со структурными изменениями хроматина [47; 52].

РЭФР как тирозинкиназа действует в качестве основного «включателя» активации фактора транскрипции – активаторного белка-I (AP-1) и других родственных систем. Нарушение функций сигнальной системы с участием РЭФР приводит к тому, что рецептор действует как онкобелок, а, соответственно, «неисправность» клеточной сигнальной сети приводит к развитию рака и другим пролиферативным заболеваниям. Не удивительно, что нарушение функциональной активности РЭФР и его лигандов обуславливает более 70% всех злокачественных опухолей [36; 38]. Помимо этого, активация рецепторов ЭФР во всех тканях вызывает целый ряд изменений в физиологии клеток: повышается проводимость канала Na^+/H^+ , увеличивается приток Ca^{2+} , активируется гликолиз, повышается биосинтез простагландинов и активность орнитиндекарбоксилазы, в клетке накапливается путресцин и повышается образование инозитола. Кроме того, изменяется мембранный потенциал, активируются протеинкиназа C и фосфорилирование 6S-рибосомы, увеличивается экспрессия ряда онкогенов, синтез ДНК. В общем случае семейство тирозинкиназ, к которым относится и РЭФР, вызывая указанные изменения в клетке, регулируют дифференцировку, апоптоз, пролиферацию, подвижность и выживаемость как нормальных, так и опухолевых клеток. Кроме того, семейство рецепторов ЭФР регулируют также, что особенно важно для опухолей, ангиогенез [24].

Диагностическая и прогностическая значимость частоты выявления и определения уровней РЭФР

Стандартизованные подходы к определению РЭФР на основе радиOLIгандного метода появились только в 1990 г., который впоследствии был рекомендован к применению EORTC. Тем не менее, не исключено и более частое использование полуколичественных иммуногистохимических методик, поскольку эти методы более доступны и безопасны в условиях обычных клиник и позволяют более точно охарактеризовать РЭФР-экспрессирующие клетки [13].

В настоящее время расширяется число исследований, в которых определяется связь между экспрессией РЭФР и другими маркерами, в основном онкобелками, однако такие исследования носят пока характер теоретических и их результаты еще более противоречивы, хотя перспектива таких исследований не вызывает сомнений. Экспрессия РЭФР наблюдается примерно в 40–45 % злокачественных опухолей молочных желез, в опухолях желудочно-кишечного тракта, легкого, мочевого пузыря, в ткани рака яичников, матки, предстательной железы и в опухолях некоторых других локализаций.

Наличие РЭФР, как правило, коррелирует с неблагоприятными клинико-морфологическими факторами и является признаком плохого прогноза заболевания и сниженной чувствительности к эндокринной терапии при опухолях гормонозависимых органов. Следовательно, нарушение процессов секреции ростовых факторов и, в особенности, процессов восприятия и передачи их рост-стимулирующего сигнала может оказаться перспективным новым подходом к терапии опухолей самых разных локализаций [42; 51].

При этом для наиболее адекватного и эффективного использования подобных методов необходимо предварительный отбор больных на основании определения содержания РЭФР в опухолях [18].

Подавления функции РЭФР можно добиться двумя способами – блокированием экстрацеллюлярного домена рецептора или ингибированием активности тирозинкиназы интрацеллюлярного домена.

Решение первой задачи возможно с помощью моноклональных антител, и для этого было создано несколько препаратов. Первым моноклональным антителом против РЭФР, принятым для клинического применения, стал трастузумаб (Герцептин). Клинические испытания препарата начались в 1992 г., первое сообщение об эффективности при РМЖ появилось в 1996 г. [22; 49]. Важное значение трастузумаба для истории противоопухолевой ХТ связано с тем, что он, по видимому, является первым клинически применяемым препаратом, созданным на базе фундаментальных исследований онкогенов в 1970–1980 гг.

Трастузумаб является моноклональным антителом против рецептора HER-2 и, следовательно, может рассматриваться как первый препарат, направленный на продукцию протоонкогена. Гиперэкспрессия HER-2 на поверхностной мембране опухолевых клеток определяется в 20–30 % случаев РМЖ, а амплификация *HER-2* отмечается в 92 % случаев HER-2⁺ рака молочной железы [39; 41; 54]. Уровень белка HER-2 на поверхности HER-2⁺ клеток РМЖ на несколько порядков выше, чем в клетках окружающего нормального эпителия молочной железы. Гиперэкспрессия HER-2 на поверхности клеток сопровождается усиленным высвобождением внеклеточного домена рецептора.

К концу 1980 гг. сотрудниками исследовательской компании Genethes Inc. получено более 100 моноклональных антител к различным участкам внеклеточного домена рецептора путем иммунизации мышей клетками РМЖ человека [30; 31]. По результатам оценки влияния этих моноклональных антител на культуру клеток РМЖ с гиперэкспрессией HER-2 было отобрано одно моноклональное антитело (mab 4D5), обладавшее наибольшим ингибирующим действием на пролиферацию этих клеток. В последующих исследованиях была показана эффективность mab 4D5 на ксенографтах РМЖ человека с повышенным уровнем экспрессии HER-2 и отсутствием эффекта на культуре опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии HER-2 и на клетках нормального эпителия молочной железы. Было установлено, что это моноклональное антитело специфически связывается с HER-2 и не реагирует с другими рецепторами семейства ErbB [28].

Дальнейшие работы были направлены на создание гуманизированного моноклонального антитела, для чего методом рекомбинантной ДНК 95 % мышинных частей mab 4D5 были заменены структурами нормального человеческого иммуноглобулина. В оставшихся 5 % мышинной части mab 4D5 были оставлены гипервариабельные антигенсвязывающие регионы исходного мышинного mab 4D5, что позволило в гуманизированном МКА сохранить способность к высокоаффинному распознаванию антигена. Модельные эксперименты по оценке способности полученного препарата связываться с внеклеточными участками HER-2 показали: аффинность препарата к рецептору в 3 раза выше, чем у исходного мышинного mab 4D5 [25].

Иным направлением создания аналогов трастузумаба является получение МКА к другим участкам HER-2. Два таких препарата проходят 1 фазу

клинических испытаний. Один из них, 2С4, направлен на блокирование сегмента HER-2, участвующего в димеризации рецепторов. Отмечена активность препарата при опухолях, не имеющих гиперэкспрессии HER-2 [32]. Другой препарат, МДХ-Н210, является биспецифическим МКА, направленным как против HER-2, так и против рецептора Fc γ , связывание с которым индуцирует фагоцитоз и цитолиз макрофагами клеток РМЖ с гиперэкспрессией HER-2. Дальнейшая судьба этих препаратов зависит от результатов клинических испытаний.

Важную роль в регуляции пролиферации и выживаемости клеток играет рецептор ErbB-1 (HER-1), который после связывания с соответствующим лигандом и димеризации активируется и индуцирует трансдукцию митогенного сигнала к ядру клетки. Создано несколько препаратов с таким механизмом действия, наиболее изученным среди них является С-225 (цетуксимаб) [53].

Идея создания цетуксимаба была сформулирована в 1980 г. J. Mendelson, который предложил получить МКА к одному из РЭФР. В 1983 г. были получены мышинные МКА с высокой аффинностью к экстрацеллюлярному домену рецептора (М-225), а позже созданы и переданы на экспериментальное изучение химерные МКА (С-225) [17]. Аффинность С-225 к рецептору приблизительно в 10 раз выше, чем у М-225 и природного лиганда. С-225 вызывает димеризацию и интернализацию РЭФР, что ведет к ингибированию его сигнальной активности и блокированию клеточной пролиферации.

Но, несмотря на это, применение ингибиторов РЭФР (как и большинства других таргетных препаратов) в виде монотерапии может привести лишь к замедлению роста опухоли, что обосновывает их применение в комбинированной терапии с другими цитостатиками. В этой связи важно, что в предклинических исследованиях выявлен синергетический и аддитивный эффект при применении цетуксимаба в сочетании с ЛТ, рядом цитостатиков, герцептином.

В отличие от трастузумаба цетуксимаб малоэффективен при РМЖ, что связано с образованием в результате определенной мутации *ErbB-1* в клетках этой опухоли конституитивно постоянно активированного мутантного ErbB-1 v III. В экспериментальных исследованиях установлено усиление противоопухолевой эффективности цисплатина, паклитаксела, доксорубицина при сочетании их с цетуксимабом, а также эффективность последнего при опухолях, резистентных к цисплатину и иринотекану. Ведутся клинические испытания эффективности использования цетуксимаба в комбинированной ХТ с этими препаратами [20; 29].

В 2001–2002 гг. появились сообщения о 1-й фазе клинических испытаний еще трех МКА к РЭФР, которые, в отличие от химерного С-225, являются полностью гуманизированными. Для всех трех препаратов – АВХ-EGF (панитумаб), h-Ras, EDD-72000 (матузумаб) – отмечено наличие противоопухолевой активности, сопоставимой с эффективностью цетуксимаба, при умеренной токсичности [19]. Клинические испытания этих препаратов продолжаются.

Помимо блокирования экстрацеллюлярного домена РЭФР, подавление функции этого рецептора можно добиться ингибированием активности тирозинкиназы интрацеллюлярного домена. Первым ингибитором тирозинкиназы HER-2, предложенным в качестве противоопухолевого агента, стал препарат эмодин, о противоопухолевых свойствах которого впервые сообщили в 1995 г. L. Zhang et al. [55], однако практического применения не нашел.

Одним из первых препаратов – ингибиторов тирозинкиназы, введенных в клиническую практику, является гифитиниб (ZD1839), синтезированный и изученный в исследовательских лабораториях фармацевтической компании Astra Zeneca, выпускаемый под названием «Иресса», по химической структуре – производное анилинохиназолина.

Впервые о противоопухолевых свойствах этого соединения было сообщено в 1996 г. В клинических испытаниях 1-й фазы, о которых было сообщено в 2000–2002 гг., продемонстрирована возможность достижения объективного эффекта с помощью монотерапии гифитинибом у больных немелкоклеточным раком легкого и плоскоклеточным раком головы и шеи. [21; 35]

Эти данные были подтверждены в последующих испытаниях 2-й фазы, причем объективный эффект от лечения наблюдался и при применении препарата в терапии 2–3-й линии.

В 2003 г. гифитиниб разрешен для практического применения при лечении больных НМРЛ [44].

Результаты клинических испытаний комбинированного применения гифитиниба с цисплатиной, гемцитабином, паклитакселом у больных НМРЛ оказались абсолютно разочаровывающими – улучшения результатов лечения не наблюдали ни в одном исследовании.

Различия в мишенях, на которые действуют трастузумаб и гифитиниб, стали основанием для исследования эффективности сочетания этих препаратов. В качестве модели были выбраны клеточные линии РМЖ SBR-3 и BT-474, для которых характерны высокий уровень экспрессии HER-2 и низкое содержание РЭФР.

Показано, что комбинация трастузумаба и гифитиниба обладает на этих клетках синергетическим свойством, проявляющимся усилением апоптоза. По результатам исследования сделано заключение, что эти препараты не только имеют разные мишени, но и проявляют свою активность по разным и неперекрещивающимся механизмам [46].

Другим препаратом с таким же механизмом действия является эрлотиниб (OSI-774), имеющий торговое название «Тарцева». Способность этого соединения ингибировать тирозинкиназу РЭФР была обнаружена в 1997 г. [45].

А о 1-й фазе клинических испытаний у больных с различными солидными опухолями впервые сообщили в 1999 г. [40]. Эрлотиниб также представляет собой производное хинозолина, обратимо ингибирует тирозинкиназу РЭФР.

Этот эффект весьма значителен – фосфорилирование рецептора при действии эрлотиниба снижается на 60 %, при этом полностью прекращается фосфорилирование одного из сигнальных белков [15]. Во время 1–2-й фаз клинического изучения эрлотиниба, проводившихся в 2001–2002 гг., отмечен эффект при НМРЛ, раке органов головы и шеи, яичников.

В 2004 г. препарат разрешен для практического применения при НМРЛ.

К ингибиторам тирозинкиназы относится препарат иматиниб (STI-571) (торговое название Гливек). Однако, в отличие от гифитиниба и эрлотиниба, иматиниб ингибирует тирозинкиназную активность не только рецепторов некоторых факторов роста, но и химерного белка, продукта химерного гена *BCR/ABL*, который образуется в гемопатических клетках вследствие транслокации *ABL* с хромосомы 9 на хромосому 22 – появляется т.н. «филадельфийская» хромосома.

В результате экспрессии *BCR/ABL* образуется химерный белок p210, обладающий повышенной тирозинкиназной активностью, появление которого в гемопатических клетках-предшественниках приводит к нарушению их нормального функционирования клетки и злокачественной трансформации.

Со временем клетки, содержащие онкобелок p210, вытесняют нормальные стволовые клетки, развивается клиничко-гематологическая картина ХМЛ [33]. Важное значение этого препарата для истории противоопухолевой химиотерапии обусловлено тем, что он, по-видимому, является первым рационально сконструированным синтетическим противоопухолевым препаратом, действующим на конкретную молекулярную мишень.

Совместное применение иматиниба и гифитиниба показало, что тирозинкиназу РЭФР следует считать перспективной мишенью для создания новых препаратов.

Интенсивные поиски в этом направлении привели к созданию еще нескольких агентов с таким механизмом действия, уже переданных на клинические испытания. CW572016 (лапатиниб; также производное хинозолина) является обратимым двойным ингибитором тирозинкиназы: одновременно ингибирует тирозинкиназу HER-1 и HER-2.

При создании этого препарата предполагалось, что он должен быть более активным, чем ингибитор тирозинкиназы только HER-1 или только HER-2, а также превосходить по эффективности моноклональные антитела к этим рецепторам. В опытах *in vitro* эти предположения были полностью подтверждены [48].

В 2002 г. была изучена фармакокинетика препарата на здоровых добровольцах, а в августе 2003 г. начаты клинические испытания препарата по 1-й фазе у больных с различными злокачественными опухолями как в режиме монотерапии, так и в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами разных групп [16].

Выводы

1. РЭФР – трансмембранный белок, являющийся продуктом одного из онкогенов семейства *erb*. ЭФР – относительно низкомолекулярный полипептид с молекулярной массой около 6 кДа, взаимодействующий с рецептором (РЭФР) на мембранах чувствительных клеток.
2. В настоящее время известно, что подавления функции РЭФР можно добиться двумя способами: блокированием экстрацеллюлярного домена рецептора и ингибированием активности тирозинкиназы интрацеллюлярного домена.
3. Можно считать достоверным, что гиперэкспрессия РЭФР играет важную роль в канцерогенезе и является маркером, характеризующим биологическое поведение опухоли, и позволяющим индивидуализировать подходы к назначению терапии больным злокачественными новообразованиями.
4. Применение ингибиторов РЭФР (как и большинства других таргетных препаратов) в виде монотерапии может привести лишь к замедлению роста опухоли, что обосновывает их применение в комбинированной терапии с другими препаратами, облучением и т.п.

Литература

1. *Арсенин С.Л.* Молекулярно-биологическая диагностика в онкологии (лекция) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – №10. – С. 25–32.
2. *Берштейн Л.М.* Онкоэндокринология. – Санкт-Петербург: Наука, 2004. – 343 с.
3. *Ганцев Ш.Х., Хуснутдинов Ш.М.* Патология и морфологическая характеристика опухолевого роста. – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 206 с.
4. *Герштейн Е.С., Талаева Ш.Ж., Сандыбаев Н.М., Кушлинский Н.Е.* Клиническая роль системы активации плазминогена в опухолях человека // Молекулярная медицина. —2007. – №1. – С. 4–8.
5. *Дедов И.И., Мельниченко Г.А.* Эндокринология (клинические рекомендации). – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2007. – 285 с.
6. *Иващенко Ю.Д., Быкорез А.И.* Полипептидные факторы роста и канцерогенез. – Киев: Наукова думка, 1990. – 191 с.
7. *Имянитов Е.Н., Хансон К.П.* Молекулярная онкология: клинические аспекты. – СПб: Издательский дом СПбМАПО, 2007. – 211 с.
8. *Киселев В.И., Лященко А.А.* Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов. – М.: Компания «Димитрейд График Групп», 2005. – 346 с.
9. *Копнин Б.П.* Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 5–33.
10. *Копнин Б.П.* Современные представления о механизмах злокачественного роста (лекция). В материалах X Российского онкологического конгресса. – М., 2006. – С. 99–102.
11. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* Молекулярные механизмы действия гормонов I. Рецепторы. Нейромедиаторы. Системы совторичными посредниками // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 1. – С. 33–50.
12. *Носов Д.А.* Механизмы регуляции внутриклеточной передачи сигнала и апоптоза: успехи и неудачи целенаправленной терапии. В материалах VIII Российского онкологического конгресса (в разделе «Таргетная терапия злокачественных опухолей»). – М., 2004. – С. 61–5.
13. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Рахлина. – Казань: Титул, 2005. – 451 с.
14. *Смирнов А.Н.* Элементы эндокринной регуляции. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2006. – 351 с.
15. *Тюляндин С.А.* Первые результаты клинического применения ингибиторов передачи внутриклеточных сигналов // Практическая медицина. – 2002. – № 4. – С. 236–45.
16. *Adams V.R., Benco K.A., Anderson E.B. et al.* A phase I pharmacokinetic, pharmacodynamic study of oral CW572016 in healthy subjects // Proc. ASCO. – 2002. – Abstr. 374.
17. *Arnst C.* The birth of a cancer drug // Business Week (Eur. Ed.). – 2001. – P. 46–50.
18. *Arteaga C.L.* Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia // Seminar of Oncology. – 2002. – Vol. 29. – P. 3–9.
19. *Atalay G., Cardoso F., Awada A. et al.* Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer // Ann. Oncology. – 2004. – Vol. 14. – P. 1346–63.
20. *Baselga J.* Combined anti-EGF receptor and anti-HER2 receptor therapy in breast cancer: a promising strategy ready for clinical testing // Ann. Oncol. – 2002. – Vol. 13. – P. 8–9.
21. *Baselga J., Herbst R., LeRosso I. et al.* Continuous administration of ZD 1839 (Iressa), a novel oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) in patients with five selected tumor types evidence of activity and good tolerability // Proc. ASCO. – 2000. – Abstr. 177.
22. *Baselga J., Tripathy D., Mendelson J. et al.* Phase II study of weekly intravenous administration of recombinant humanized anti-p185 HER2 monoclonal antibody to patients with HER2/neu overexpressing metastatic breast cancer // J. Clin. Oncol. – 1996. – Vol. 14. – P. 737–44.
23. *Burgess A.W., Thumwood C.M.* Growth factors and their receptors: new opportunities for cancer treatment // Pathology. – 1994. – Vol. 26. – P.453–63.
24. *Carpenter G.* Employment of epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways // J. Cell Biology. – 1999. – Vol. 146. – P. 697–702.
25. *Carter P., Presta C.P., Gorman C.M. et al.* Humanization of an anti p185 HER2 antibody for human cancer therapy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 4285–589.
26. *Chinkers M.* Purified EGF receptor-kinase interacts specifically with antibodies to Raus sarcoma virus transforming protein // Nature. – 1981. – Vol. 290. – P. 516–9.
27. *Cohen S., Ushiro H., Stoscheck C., Chinkers M.* A native 170.000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles // Journal of Biological Chemistry. – 1982. – Vol. 257. – P. 1523–31.
28. *Colomer R., Shamon L.A., Tsai M.S. et al.* Herceptin: from the bench to the clinic // Cancer Invest. – 2001. – Vol. 19(1). – P. 49–56.

29. *De Bono A.J., Rowinsky E.* Therapeutics targeting signal trasduction for patients with colorectal carcinoma // Brit. Med. Bull. – 2002. – Vol. 64. – P. 227–54.
30. *Drebin J., Link V.B., Green M.* Monoclonal antibodies reactive with distinct domains of the neu oncogene-encoded p185 molecule exert synergistic antitumor effect *in vivo* // Oncogene. – 1988. – Vol. 2. – P.273–7.
31. *Fendly B.M., Winget M., Hudziak R.M. et al.* Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product // Cancer Research. – 1990. – Vol. 50. – P. 1550–8.
32. *Fox W.D., Tiudell C.A., Galkin A. et al.* Anti-tumor effects of 2C4, a humanized monoclonal antibody targeted to an epitope of the Her-2/neu extracellular domain, in human prostate cancer xenograft // Clinical Cancer Res. – 2001. – Vol. 7. – Abstr. 543.
33. *Gordon M.Y.* Cellular and molecular mechanism in chronic myeloid leukemia: biology and treatment // Brit. Journal Hematology. – 1996. – Vol. 295. – P. 10–20.
34. *Goustin A.S., Leof E.B., Shipley G.D., Moses H.L.* Growth factors and cancer // Cancer Research. – 1986. – Vol.46. – P. 1015–29.
35. *Herbst R.S., Maddox A.M., Rothenberg M.I. et al.* Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD 1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small lung cancer and other solid tumors. Results of a phase I trial // J. Clinical Oncology. – 2002. – Vol. 20. – P. 3815–25.
36. *Holt S.J., Alexander P., Inman C.B., Davies D.E.* Epidermal growth factor induced tyrosine phosphorylation of nuclear proteins associated with translocation of epidermal growth factor receptor into the nucleus // Biochemical Pharmacology. – 1994. – Vol. 47. – P.117–26.
37. *Hsuan J.J.* Oncogene regulation by growth factors // Anticancer Research. – 1993. – Vol. 13. – P. 2521–32.
38. *Hunter T., Broome M., Schlaepfer D.* Signaling by tyrosine phosphorylation. Fifth International Congress Hormones and Cancer. – Quebec City, 1995. – P. 25.
39. *Hynes N.E., Garber H.A., Sanrer S. et al.* Overexpression of the c-erbB-2 protein in human breast tumor cell lines // Journal Cell Biochem. – 1989. – Vol. 39. – P. 167–73.
40. *Karp D.D. et al.* Phase I dose escalation study of anti-epidermal growth factor (EGF) tyrosine kinase inhibitor CP358, 774 in patients with advanced solid tumors // Proc. Asco. – 1999. – Vol. 18. – Abstr. 388.
41. *King C.R., Kraus M.H., Aronsen S.A.* Amplification of a novel C-erbB-related gene in a human mammary carcinoma // Science. – 1985. – Vol. 229. – P. 974–6.
42. *Leung B.S., Stout L., Zhou L.* Evidence of an EGF/ TGF-alpha-independent pathway for estrogen-regulated cell proliferation // J. Cellular Biochemistry. – 1991. – Vol. 46. – P. 125–33.
43. *Mendelson J.* Epidermal growth factor receptors as a target for therapy with antireceptor monoclonal antibodies // Monography National Cancer Institution. – 1992. – Vol. 13. – P. 125–30.
44. *Mendelson J., Baselga J.* Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer // Journal Clinical Oncology. – 2003. – Vol. 21. – P. 2787–99.
45. *Moyer J.D., Barbacci E., Iwata K. et al.* Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358, 774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase // Cancer Research. – 1997. – Vol. 57. – P. 4838–48.
46. *Normanno N., Camiglio M., DeLuca N. et al.* Cooperative inhibitory effect of ZD 1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth // Ann. Oncology. – 2002. – Vol. 13. – P. 65–72.
47. *Rubinstein Y.R., Proctor K.N., Bergel M. et al.* Interferon regulatory factor-1 is a major regulator of epidermal growth factor receptor gene expression // FEBS Letter. – 1998. – Vol. 431. – P. 268–72.
48. *Rusnak D.W., Affeck K., Cockerill S.G. et al.* The characterization of novel, dual ErB-2/ EGFR tyrosine kinase inhibitors // Cancer Research. – 2001. – Vol. 61. – P. 7196–202.
49. *Shepard H.M., Lewis G.D., Sarup J.C. et al.* Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking of HER2 protooncogene to the clinic // J. Clinical Immunol. – 1991. – Vol. 11. – P. 117–27.
50. *Sweeb R.K., Beijnen J.H.* Signal transduction pathways: new targets in oncology // Pharmacological World Sciences. – 1993. – Vol. 15. – P. 233–42.
51. *Tahara E., Sumioshi H., Hata J. et al.* Human epidermal growth factor in gastric carcinoma as a biologic marker of high malignancy // Japanese J. of Cancer Research. – 1986. – Vol. 77. – P. 145–52.
52. *Wang Q., Villeneuve G., Wang Z.* Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation // EMBO Reproduction. – 2005. – Vol. 6. – P. 942–8.
53. *Yarden Y.* The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities // Eur. Journal Cancer. – 2000. – Vol. 37. – P. 3–8.
54. *Yokota J., Toyoshima K., Yamamoto T. et al.* Amplification of c-erbB2 oncogene in human adenocarcinomas *in vivo* // Lancet. – 1986. – Vol. 1. – P. 765-6.
55. *Zhang L., Chang C.J., Bacus S.S. et al.* Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin // Cancer Research. – 1995. – Vol. 55. – P. 3890–6.

УДК 577.161.1:616-006-084

*М.Я. Шашкина, П.Н. Шашкин, А.В. Сергеев***КАРОТИНОИДЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация:**

Шашкина Мария Яковлевна, ведущий научный сотрудник лаборатории по созданию нетоксичных иммуномодуляторов НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(499)-612-80-62**e-mail:** abk200645@mail.ru

Статья поступила 21.05.2009, принята к печати 25.10.2009.

Резюме

Каротиноиды – важный класс природных полиеновых пигментов, остро необходимых для всех биологических организмов. Они защищают мембраны живых клеток от разрушения активными формами кислорода, свободными радикалами при оксидативном стрессе. Многочисленные исследования свидетельствуют о профилактической роли их в оздоровлении населения, химиопрофилактике рака, сердечно-сосудистых заболеваний, катаракты и других дегенеративных и генотоксических нарушений. Наряду с высокой профилактической активностью они безопасны и перспективны для создания отечественных лечебно-профилактических средств.

Ключевые слова: каротиноиды, профилактика, антиканцер, провитамин А, генорегуляция.*M.Y. Shashkina, P.N. Shashkin, A.V. Sergeev***CAROTENOIDS AS A BASE FOR DEVELOPMENT OF CANCER CHEMOPREVENTION**

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

Abstract

The carotenoids are vital constituents of green plants and various living organisms (algae, animals, humans et. al.). Carotenoids have aroused interest as antioxidants, immunomodulators, provitamins A, geno- and enzimoregulators. Numerous studies describe different activities of carotenoids in areas of human health including cancer chemoprevention, cardiovascular and a variety of chronic degenerative diseases prevention. This review discusses the results of recent studies concerning chemical and biomedical functions of carotenoids. These compounds are safety and can be used for effective medically prevention agents.

Key words: carotenoids, prevention, anticancer, provitamin A, genoregulation.**Введение**

В последние десятилетия наблюдается стремительный рост заболеваемости и смертности населения РФ. По статистике в 2005 г. общая смертность превысила 2,3 млн. человек (в 1999 г. – 2,1 млн. человек), из них 56,5% (1,3 млн. человек) умерли от болезней системы кровообращения, 12,5% (285 тыс. человек) – от злокачественных новообразований [8]. Важными факторами для сохранения здоровья являются качество воды, вдыхаемого воздуха, пищи. Однако развитие цивилизации, сопровождающееся катастрофическим загрязнением окружающей среды, социально-экономическими потрясениями, вредными привычками, гиподинамией ухудшает уровень здоровья населения. Индустриализация пищевой промышленности (в т.ч. рафинирование, консервирование, длительное хранение) приводит к потере ценных БАВ в процессе переработки природных продуктов. Нарушается естественная взаимосвязь человека с природой. С одной стороны, в результате загрязнения окружающей среды возрастает потребность организма в БАВ, входящих в состав естественной защитной системы, а с другой – происходит уменьшение их содержания в пище из-за индустриализации пищевой промышленности. В результате население Земли в XXI веке все больше страдает от недостатка витаминов, каротиноидов, микроэлементов. По данным Института питания РАМН, 70–80 % населения России испытывают гипополивитаминоз; у 40–55 % населения наблюдается недостаток -каротина и других каротиноидов [7].

Альтернативной задачей профилактической медицины является поиск и создание отечественных эффективных лечебно-профилактических средств, способных компенсировать дефицит важнейших составляющих защитной системы организма. Особенно обострилась ситуация в нашей стране после аварии на Чернобыльской АЭС. Для ликвидации последствий аварии на государственном уровне была разработана программа по созданию отечественных препаратов, повышающих сопротивляемость организма неблагоприятным факторам среды. Создаваемые препараты должны обладать общеукрепляющим действием на организм и проявлять антиоксидантные, антимуtagenные, антиканцерогенные, иммуномодулирующие свойства. Такими свойствами обладают природные БАВ-каротиноиды, которые могут стать основой для создания эффективных лечебно-профилактических препаратов. В рамках этой программы в ВОИЦ АМН СССР был организован межотраслевой творческий научный коллектив совместно с НПО «Витамины», Белгородским витаминным комбинатом, ПО «Белмедпрепараты» и др. для проведения комплексных исследований синтетического β-каротина и природных каротиноидов. Для жизнедеятельности живых организмов каротиноиды являются абсолютно необходимыми БАВ и компонентами естественной защитной системы биомембран клеток. В результате многолетних всесторонних исследований синтетического и природного β-каротина, ликопина в РОИЦ разработана серия отечественных препаратов на их основе с включением фитовитаминных субстанций [6].

Целью работы является анализ свойств, физиологических функций каротиноидов в живой природе и перспектив использования их как основы при создании новых лечебно-профилактических препаратов.

Характеристика каротиноидов

Каротиноиды – натуральные пигменты, широко распространенные в живой природе. Их синтезируют растения, грибы и некоторые микроорганизмы. По оценкам специалистов в природе ежегодно образуется около 100 млн. тонн каротиноидов.

Годовой прирост только фукоксантина (каротиноид бурых морских водорослей) оценивается в несколько миллионов тонн. Первый представитель этого класса «каротин» выделен в 1831 г. из моркови (лат. – *carotta*), отсюда и название всего класса «каротиноиды» [32].

Химическая структура

Каротиноиды относятся к полиеновым изопреноидам терпенового ряда, преимущественно – тетра-терпенам. Содержат они, как правило, 40 атомов углерода в молекулах, построенных по единому структурному принципу. У большинства каротиноидов углеводородные молекулы симметричны и состоят из двух C_{20} половин с сопряженной системой π -связей (рис. 1). На концах молекул у некоторых расположены шестичленные циклы, у других – пятичленные или алифатические углеводородные группы и прочие модификации. Каротиноиды могут содержать в своем составе (главным образом, в циклах) гидроксильные, альдегидные, карбоксильные, эпоксидные и другие группы. Такие кислородные производные каротиноидных углеводородов принято называть ксантофилами. Для каротиноидов характерна геометрическая изомерия. В природе найдены транс- и цис-изомеры, по всем и по отдельным двойным связям (рис. 2). Конфигурация молекулы существенно влияет на физические и биологические свойства каротиноидов. За счет изомерии семейство каротиноидов может исчисляться сотнями тысяч представителей. Так, возможно существование 512 изомеров несимметричной молекулы α -каротина. У симметричной молекулы β -каротина геометрических изомеров значительно меньше. К настоящему времени выделено и изучено более 600 природных каротиноидов [45]. У бактерий найдены каротиноиды, содержащие в молекуле 45 и 50 атомов углерода, а из цитрусовых выделены апокаротиноиды с меньшим содержанием углерода (C_{30} , C_{35}).

Представители каротиноидов

Наиболее биологически важными углеводородными каротиноидами являются: β -каротин, ликопин, α -каротин. Для ксантофиллов, соответственно – лютеин, зеаксантин, астаксантин, кантаксантин, β -криптоксантин. На рис. 1 эти каротиноиды представлены в транс-конфигурации по всем π -связям («*all-trans*» изомеры). β -каротин и α -каротин содержат в своем составе по 2 кольца и относятся к циклическим каротиноидам, в том числе у β -каротина оба кольца (β -ионные) идентичны, у α -каротина β -ионные кольца одно.

Ликопин – представитель алифатических каротиноидов, является структурным изомером каротиноидов и может быть их предшественником при биосинтезе. В крови, тканях и органах человека найдено около 20 каротиноидов. В тканях каротиноиды сосредоточены в липидном бислое биомембраны, где, совместно с витамином Е, участвуют в дезактивации свободных ра-

дикалов и защите клеток от повреждений. 70–80% из всех каротиноидов, обнаруженных в сыворотке крови, составляют β -каротин, ликопин, лютеин, зеаксантин.

Низкий уровень каротиноидов в пище и плазме крови человека является показателем риска рака и других заболеваний [31; 33; 36; 37].

β -каротин

Важнейший представитель и основоположник всего класса каротиноидов. В растительных объектах на его долю приходится 20–30 % от суммы каротиноидов, образующихся в природе. Молекула β -каротина лежит в основе структуры витамина А и известных ксантофиллов: астаксантина (диокси-дикето- β -каротин), кантаксантина (дикето- β -каротин), зеаксантина (диокси- β -каротин), β -криптоксантина (окси- β -каротин) и др. Структурная формула β -каротина установлена в 1931 г. (через 100 лет после выделения) и подтверждена полным химическим синтезом в 1950 г. тремя независимыми группами исследователей. Первый промышленный выпуск синтетического β -каротина осуществлен в 1954 г. Основным природным источником β -каротина во многих странах мира является морковь. В тропических странах важным источником его служат плоды манго, папайи, красное пальмовое масло. Богаты β -каротином зеленые листья растений, овощей, где содержание его вместе с лютеином составляет более 80 % от суммы всех каротиноидов. В плазме крови и тканях человека содержится 10–20 % β -каротина от суммы всех каротиноидов и зависит от состава пищи, биодоступности, индивидуальных особенностей, патологии, вредных привычек. Суточная потребность в β -каротине для взрослого здорового человека 5 мг.

Основным депо β -каротина в организме являются печень и жировая ткань. Концентрация β -каротина в плазме крови служит показателем состояния здоровья и образа жизни человека. При снижении уровня β -каротина в плазме нарушается антиоксидантная сбалансированность организма. По данным R.G. Cutler наблюдается положительная корреляция между уровнем β -каротина в плазме крови и продолжительностью жизни приматов [17].

Экспериментально-клинические наблюдения свидетельствуют о полной безопасности β -каротина при использовании в оптимальных дозах и режимах. В США β -каротин применяется с 1975 г. для лечения фоточувствительности у взрослых с эритропропорфирией в дозе < 180 мг/день. Токсичности не наблюдалось [32] даже при использовании в дозах >180 мг/день в течение 1–2 мес.

Ликопин

Является вторым каротиноидом по значимости для здоровья и распространенности, преобладает в томатах и один из основных в плазме и тканях американцев [32; 70]. Потребление томатных продуктов, содержащих ликопин, способствует снижению окислительного стресса и, как следствие, риска хронических заболеваний (рак, сердечно-сосудистые и пр.) [14; 25; 52]. Уровни ликопина в сыворотке крови и тканях являются показателями риска рака легкого и простаты.

Ликопин (как и β -каротин) защищает также от онкологических заболеваний других локализаций [9; 70]. Он не обладает А-витаминной активностью, так как не содержит β -ионного кольца, но является мощным антиоксидантом, превосходящим β -каротин. Эпидемиологические исследования показали обратную зависимость между уровнем ликопина в крови и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний [52].

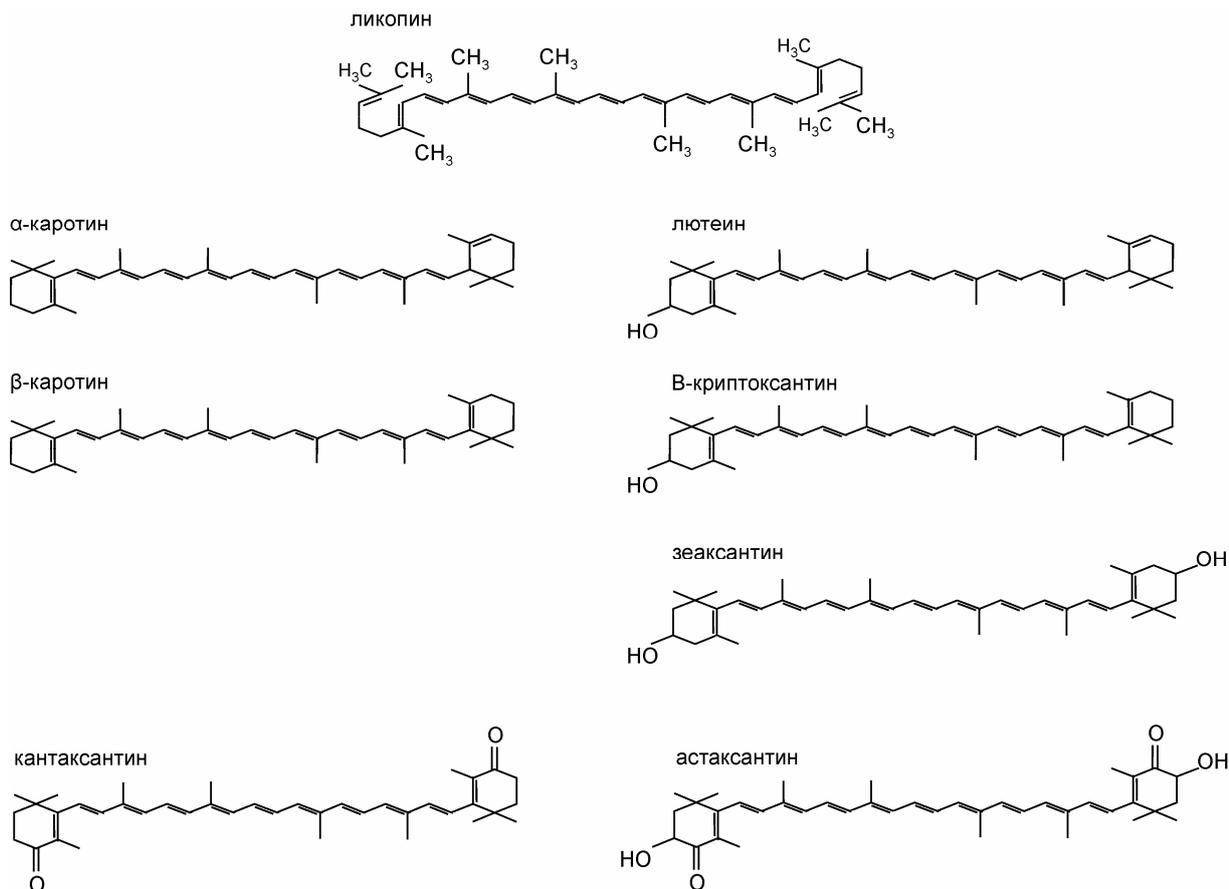


Рис. 1. Структуры каротиноидных углеводов и соответствующих ксантофиллов.

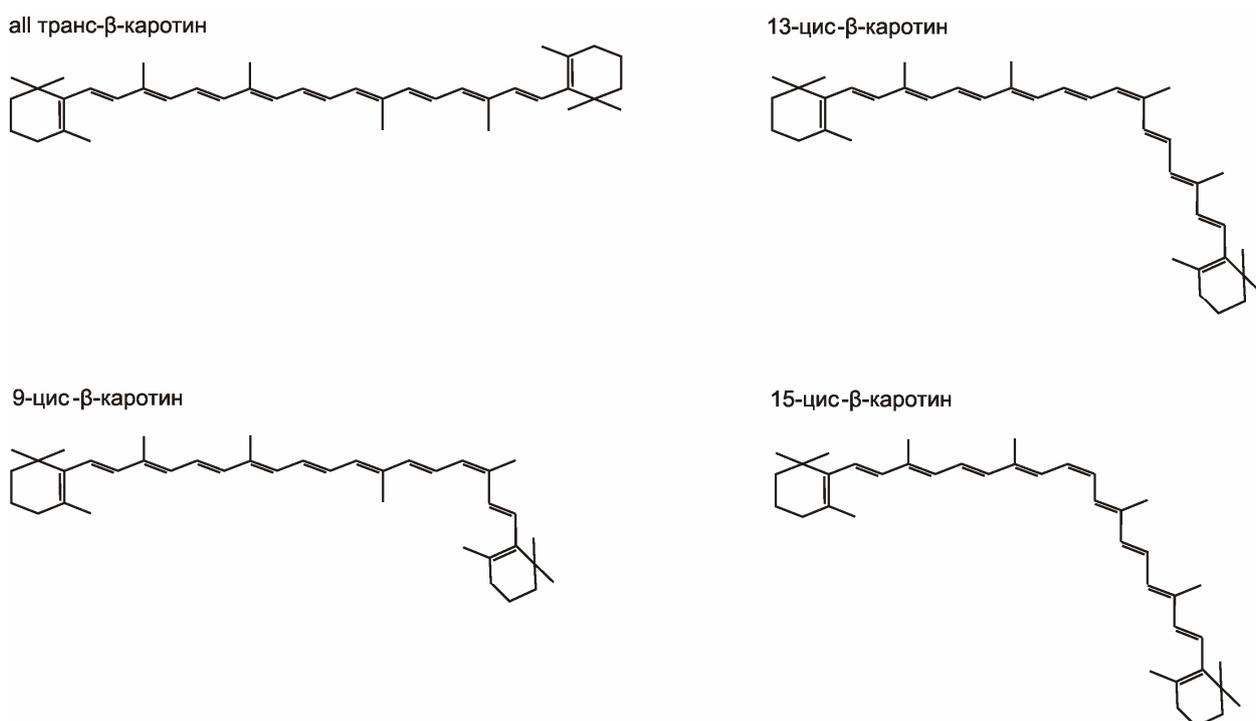


Рис. 2. Структуры полностью транс- и моно цис-изомеров β-каротина.

Анализом случай-контроль 108 больных атеросклерозом выявлена отрицательная корреляция между уровнем ликопина в плазме крови и риском атеросклероза [37]. В отличие от β -каротина, цис-изомеры ликопина лучше усваиваются организмом, чем транс-изомеры, т.е. имеют большую биодоступность [13]. Комбинация низких доз ликопина с витамином Д₃ проявляет синергический эффект на пролиферацию и дифференцировку клеток, а сочетание ликопина с лютеином или α , β -каротином, в т.ч. и в многослойных липосомах, усиливает антиоксидантные свойства отдельных компонентов [28; 62]. При этом β -каротин повышает биодоступность ликопина [35].

Лютеин и зеаксантин

Обнаружены в желтом пятне сетчатки глаза. Они являются важнейшими каротиноидами, которые защищают глаза от возрастных патологий (катаракта, макулярная дегенерация или поражение желтого пятна сетчатки) [42].

Эти каротиноиды составляют макулярный пигмент, предохраняющий от повреждений и патологий, за счет поглощения «вредного» голубого света, который попадает в глаз [26; 34; 38; 58]. Подтверждена их роль в снижении риска РМЖ, сердечно-сосудистых, глазных заболеваний [42]. В природе лютеин и зеаксантин содержатся в яичном желтке, цветах бархатцев, календулы, люцерне. Лютеин один из основных каротиноидов зеленых растений мира и наиболее преобладающий каротиноид в плазме крови (но у жителей индустриальных стран его уровень не больше, чем у других). Лютеин присутствует в сыворотке крови детей с патологией всасывания и усвоения жира, даже если другие каротиноиды не обнаруживаются. Лютеин широко распространен в овощах и фруктах. В высоких концентрациях он содержится в зеленых частях растений.

Наиболее богатыми источниками лютеина являются шпинат, капуста брокколи, настурция [32].

Зеаксантин менее распространен и встречается как минорный каротиноид, сопутствующий лютеину в соотношении 1,6:4,2. Зеаксантин найден в кукурузе, красном сладком перце, шпинате. В промышленном масштабе эти каротиноиды получают из бархатцев, календулы, люцерны и других природных источников. В отличие от ликопина и β -каротина они более стабильны и труднее деградируют под влиянием природного солнечного света и УФ-облучения. Предполагают, что именно эта повышенная антиокислительная способность (емкость) лютеина и зеаксантина объясняет содержание их в пигменте пятне сетчатки глаза [60].

β -криптоксантин содержится в плазме крови жителей западных стран, но в значительно меньшей концентрации, чем β -каротин и лютеин. Он обладает А-витаминной активностью, так как содержит одно β -ионное кольцо. Основным природным источником криптоксантина являются цитрусовые. Содержится он также в томатах, папайе и др. [32]. Эпидемиологические исследования показали, что криптоксантин может снижать риск развития воспалительных полиартритов [50].

Кантаксантин – красно-оранжевый пигмент, найденный в морской форели, ракообразных, водорослях и некоторых съедобных грибах. Синтетический кантаксантин получают из β -каротина [32].

Астаксантин и фукоксантин – кислородосодержащие каротиноиды (ксантофиллы) в больших количествах содержатся в различных морских водорослях. Обладают высокой антиоксидантной активностью [32].

Биосинтез каротиноидов

Только растения и бактерии, но не животные, способны синтезировать *de novo* каротиноиды. Практически все растения повсеместно, включая водоросли и грибы, образуют каротиноиды в процессе метаболизма. Углеводородное ядро каротиноидов синтезируется в хлоропластах растений и водорослей по общей схеме через ключевую изопреновую группу (C₅): из глюкозы или ацетата в мевалонат с последующей инверсией, десатурацией и циклизацией. В качестве промежуточных продуктов при этом образуются геранилфосфат (C₁₀), фарнезилдифосфат (C₁₅), геранил-геранилдифосфат (C₂₀), фитоен (C₄₀). Жесткость сопряженной полиеновой системы предотвращает циклизацию по типу ди- и тритерпеноидов. Она ограничивается образованием 6-членного кольца на одном или обоих концах молекулы ациклического предшественника типа ликопина. Если десатурация завершается до начала циклизации, то предшественником моно- и дициклических каротиноидов (α -, β -, γ -каротины) является ликопин. Другие индивидуальные каротиноиды синтезируются при последующей модификации. Гидроксилирование каротиноидных углеводородов и образование ксантофиллов (кислородных производных) происходит энзиматически с участием молекулярного кислорода под генным контролем [4; 15; 29; 57]. Свет стимулирует дополнительное образование каротиноидов, а для фотосинтезирующих бактерий он необходим. На биосинтез каротиноидов существенное влияние оказывают и другие факторы: аэрация, pH среды, температура, источники углерода и водорода. В организме животных и человека каротиноиды не образуются, из-за отсутствия у них некоторых ферментов, в частности, ферментов десатурации (дегидрирования). Поэтому все потребности в каротиноидах человек и животные удовлетворяют за счет растительной пищи. В их организме может происходить незначительная модификация каротиноидов. Поскольку каротиноиды играют важную роль в жизнедеятельности человека, с развитием цивилизации потребность в них резко возросла. Возникает необходимость разработки промышленного производства их с использованием биотехнологических, генно-инженерных, химико-синтетических методов [32; 40; 57; 65].

Получила развитие биотехнологическая схема производства различных каротиноидов с использованием растений, грибов, бактерий [2; 3; 32].

Биологический функции каротиноидов в живой природе

Роль каротиноидов в живой природе и жизнедеятельности человека многогранна, начиная от пигментирующей, фото-защитной, антирадикальной, антиоксидантной, А-витаминной и кончая участием в регуляции энзиматической активности и генного контроля.

Пигментирующая функция

Каротиноиды, являясь природными пигментами, придают ярко-желтую или красно-оранжевую окраску овощам и фруктам; обеспечивают пигментацию наружных покровов животных, за исключением млекопитающих. Желто-красные перья многих видов птиц пигментированы каротиноидами. У морских животных каротиноиды находятся в комплексе с белками (липо- и гликопротеинами). Такие комплексы растворяются в воде и более стабильны, чем отдельные компоненты.

Комплексы каротино-протеинов имеют пурпурный, голубой или зеленый цвет, в отличие от желто-оранжевого, присущего каротиноидам, вероятно, за счет электронного сдвига при комплексовании. Они термолабильны и при нагревании распадаются с изменением цвета [1]. Окраска внешних покровов помогает животным маскироваться (например, сезонное изменение окраски) или служит для опознания, предупреждения, отпугивания, имеет сексуально-демонстрационную природу.

Пигментация – это одна из физиологических функций, которую выполняют каротиноиды в живой природе. Пигментирующая способность каротиноидов широко используется в жизнедеятельности человека, в том числе для подкрашивания пищевых продуктов (молочные, кондитерские), лекарств и придания им эстетического вида [32].

Фотозащитная функция

Основная роль каротиноидов в биологических тканях обусловлена их способностью поглощать свет. Имея сопряженную систему связей, каротиноиды (β -каротин, лютеин и др.) входят в состав светопоглощающего пигментного комплекса растений. Совместно с хлорофиллами они участвуют в регуляции фотосинтеза, предотвращая повреждение фотосинтетических клеточных мембран синглетным кислородом (1O_2). Каротиноиды являются наиболее эффективной «ловушкой» синглетного кислорода. Они способны превращать 1O_2 в нормальное триплетное состояние, рассеивая избыток энергии возбуждения. Одна молекула β -каротина способна улавливать до 1 000 молекул синглетного кислорода, но необратимость процесса окисления и разрушение каротина ограничивают эту емкость. Каротиноиды принимают энергию возбуждения «триплетного» хлорофилла или реагируют непосредственно с 1O_2 . При ярком освещении они способны поглощать кванты света в спектральной области, где коэффициент экстинкции молекул хлорофилла низкий, т.е. каротиноиды выполняют антенные функции [24]. Предполагается, что активация этого механизма сигнализируется конверсией виолоксантина в зеаксантин, но детали процесса не изучены. Фотосинтетический аппарат клеток исключительно сложный. Реакционный центр фотосинтетических бактерий содержит около 10 000 атомов. Фотозащитная функция каротиноидов является главной функцией во всех живых организмах (от растений, бактерий до животных и человека). У последних они участвуют в фотозащите кожных покровов, органов зрения и других жизненно-важных тканей от фотоокислительного повреждения. Каротиноиды, выполняя роль своеобразной «ловушки» свободных радикалов (R'), способны гасить энергию возбуждения электрона без каких-либо химических превращений за счет делокализации электрона сопряженной системой связей. Каротиноиды как структурные элементы встраиваются в клеточные мембраны и защищают их от повреждений R' . В организме человека и животных они реагируют с широким спектром R' (O_2 , CCl_2 , SO_2 , NO_2 + различные арилпероксиды и др.) посредством электронного переноса или образования аддуктов с S-центральным радикалом [46]. Каротиноиды входят в состав природной антиоксидантной защиты биомембран всех клеток и тканей организма. Потребление любого доступного источника каротиноидов значительно снижает фотоокислительные повреждения биомембран, целостность клеток и тканей, инициируемых

УФ-облучением [27; 51; 58; 63]. Таким образом основная функция каротиноидов заключается в защите клеточных биомембран и целостности клеток от повреждающего действия солнечного излучения, радиации, R' различного профиля.

A-витаминная функция каротиноидов

Важным свойством каротиноидов является способность (в присутствии ферментов) превращаться в организме человека и животного в витамин А (ретинол, ретиналь).

Роль витамина А в жизнедеятельности человека и животных

Витамин А и его аналоги (ретиноиды) являются регуляторами жизненно-важных биологических процессов. Витамин А необходим для:

- нормализации дифференцировки клеток, особенно эпителиальных;
- сохранения и функционирования иммунной системы;
- репродукции эмбрионального развития;
- поддержания функционального состояния зрения и кожных покровов;
- цис-ретиналь входит в состав зрительного фоторецептора – родопсина, энзиматическая фотоизомеризация которого в транс-форму приводит к ощущению зрения [44].

Дефицит витамина А является наиболее серьезным дефицитом в мире, так как сопровождается повышением инфекционных заболеваний, индуцирует воспаление, ухудшает состояние зрения и кожных покровов. Длительный дефицит и гиповитаминоз А могут привести к ксерофтальмии и слепоте. Недостаток витамина А является важным фактором заболеваемости и смертности детей во многих развивающихся странах мира и проблемой, от которой зависит здоровье населения этих стран [19; 53]. Рандомизированные исследования показали, что применение витамина А женщинами во время и после беременности снижало материнскую и детскую смертность [67]. Витамин А также способствует снижению риска передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку [59; 64], предотвращает болезненность и смертность новорожденных с очень низкой массой тела или недоношенных [18], предохраняет от вторичного инфицирования детей корью [20]. Общая смертность детей, принимающих витамин А, снижалась на 39 % [21, 22]. При добавлении витамина А в пищу детей дошкольного возраста уменьшался риск заболеваемости и смертности от кори, диареи, ВИЧ-инфекции, малярии [22; 23].

Витамин А, его аналоги и метаболиты влияют на разнообразные процессы жизнедеятельности от эмбриогенеза, морфогенеза до метаболизма. На модели птичьего эмбриона показано, что витамин А необходим с момента образования примитивного сердца, спецификации заднего мозга [16]. Дефицит витамина А в этот критический период приводит к росту нарушений и ранней гибели эмбрионов. В модельной системе на грызунах выявлено, что гиповитаминоз А может пагубно влиять на поздних сроках беременности. Главные ткани-мишени последствий дефицита витамина А: сердце, ЦНС, урогенитальный тракт, респираторная, циркуляторная системы. При авитаминозе А происходит также ненормальное развитие черепа, скелета, конечностей [72]. Поэтому суточная потребность в витамине А для беременных и кормящих женщин возрастает с 1,5 до 2,0–2,5 мг, а в экологически неблагоприятных регионах (условия Крайнего Севера, промышленно-развитые области) увеличивается еще в 1,5–2 раза.

Лимитирующим фактором применения витамина А является опасность передозировки, которая выражается в тератогенности и эмбриотоксичности [5; 41; 66]. Для нормального безопасного обеспечения организма витамином А специалисты рекомендуют 1/3 его потребности удовлетворять продуктами, содержащими витамин А, а 2/3 – продуктами, обогащенными каротиноидами [5].

Каротиноиды как источники витамина А

Каротиноиды являются основным, безопасным и единственным источником природного витамина А. В организме человека и животных он образуется при ферментативном метаболизме каротиноидов. Других путей получения витамина А в природе неизвестно [49]. Каротиноиды сами нетоксичны, а образование из них витамина А энзиматически лимитировано. Поэтому при потреблении каротиноидов передозировки витамина А не происходит. Однако не все каротиноиды обладают А-витаминной активностью. Из 600 найденных в природе каротиноидов только 40 регулярно потребляются человеком и некоторые из них (10%) проявляют А-витаминные свойства [10]. Уникальным источником витамина А является β-каротин (провитамин А). Его молекула симметрична и состоит из 2 остатков витамина А. Биоконверсия β-каротина в витамин А происходит путем окислительного метаболизма молекулы по центральной 15–15 π-связи под влиянием фермента β-каротин-15–15 диоксигеназы (ДОГ) [39]. В растениях этого фермента нет, поэтому растительные объекты витамина А не содержат. Витамин А содержится только в продуктах животного происхождения (яичный желток, сливочное масло, печень животных и рыб).

Ключевым продуктом окислительного расщепления β-каротина в организме животных и человека является ретиналь, который ферментативно восстанавливается в ретинол (рис. 3). Ретинол этерифицируется и затем депонируется в печени или окисляется через ретиналь в ретиноевые кислоты в присутствии ретинол-дегидрогеназы и цитохрома р450. Ретиноевые кислоты участвуют в регуляции экспрессии различных генов, способствуют химиопрофилактике, а также повышают степень дифференцировки нейтрофилов при лечении лейкозов [43; 45]. При высоком уровне витамина А в плазме крови активность ДОГ падает и биоконверсия β-каротина в витамин А прекращается, а при низком – вновь повышается расщепляющая активность ДОГ [69]. Активность ДОГ является регулирующим фактором образования в организме физиологически оптимального количества витамина А и ретиноевых кислот из каротиноидов.

Кроме β-каротина в витамин А метаболизируются другие каротиноиды, содержащиеся в молекуле хотя бы одно β-ионное кольцо без кето- и гидроксигрупп (α-каротин, β-криптоксантин и пр.). Такие широко распространенные каротиноиды, как ликопин (ациклический каротиноид), лютеин, зеаксантин, астаксантин (содержащие гидроксильные и кетогруппы в β-ионных циклах), А-витаминной активностью не обладают. Однако в эксперименте на двух моделях витамин А-дефицитных животных (крысы, птицы) показана их эффективность, соизмеримая с β-каротином (в тестах защиты эпителиальных тканей крыс, повышения массы тела и уровня ретинола в плазме крови птиц). Но для этого потребовалось повысить молекулярные дозы таких каротиноидов в 20 раз, по сравнению с β-каротином, и только в комбинации с минимальным количеством витамина А. Без витамина А эффекта не было даже при использовании мега-доз [71]. Усвоению каротиноидов из пищи способствуют

жиры и растительные масла, содержащие растительные стеролы, которые влияют на снижение холестерина в плазме крови и увеличение уровня каротиноидов [47; 48]. Биодоступность каротиноидов улучшает оливковое масло. Предполагают, что липиды влияют также на биоконверсию β-каротина в витамин А [54].

Специфические функции каротиноидов

Недавно обнаружены новые функции каротиноидов, не связанные с их антиоксидантной и А-витаминной активностью. Показано, что каротиноиды влияют на клеточные сигнальные пути [61]. Они способны активировать экспрессию генов, которые кодируют продукцию белка коннексина-43 [11; 12], который является интегральным компонентом межклеточного взаимодействия. Известно, что большинство органов сообщаются между собой посредством водозаполненных пор, названных коннексаонами. Через них клетки могут обмениваться питательными веществами, сигнальными молекулами (цАМФ, Са²⁺ и пр.), продуктами обмена веществ. Такие поры могут служить для передачи ростигибирующих сигналов пролиферации aberrантных или полностью трансформированных клеток. В норме посредством межклеточных взаимодействий осуществляется контроль и регуляция клеточного роста. При неопластической трансформации (канцерогенезе) межклеточные контакты нарушаются (гипотеза Ловенштейна). В экспериментах *in vitro* показано, что опухолевые клетки разобщены, плохо контактируют между собой, поэтому происходит их бесконтрольная пролиферация и рост опухолей. Предполагают, что ингибирующее действие каротиноидов на опухолевый процесс тесно связано с их способностью улучшать межклеточные связи посредством повышения экспрессии белка коннексина-43 как трансмембранного протеина. Связь клеток через поры служит своеобразным трубопроводом для регуляции сигнала роста от нормальных клеток к aberrантным. По данным J.S. Bertram et A.L. Vine [12; 68] только усиление межклеточных связей (а не А-витаминная и антиоксидантная активности каротиноидов) статистически значимо коррелировала с ингибированием неопластических трансформаций в стадии постинициации канцерогенеза. В то же время не было такой корреляции между трансформацией и перекисным окислением липидов. Иммунофлуоресцентным методом показано, что усиление межклеточных связей β-каротином вызвано повышением экспрессии гена белка коннексина-43 (структурного протеина), обеспечивающего межклеточные взаимодействия. Экспрессия коннексина-43 коррелирует со снижением индекса неоплазии. Методом измерения экспрессии гена коннексина-43 показано, что наиболее геноэкспрессионны β-каротин, кантаксантин и лютеин. Известные антиоксиданты ликопин, α-токоферол и α-каротин уступали им в несколько раз. Одновременное применение β-каротина или астаксантина и ретиноидов приводило к суперрадикальной «up»-регуляции этого протеина и индукции антиканцерогенной активности [30].

Ретиноевые кислоты также могут активировать ген коннексина-43, но только после связывания их с ретиноевым рецептором, тогда как β-каротин не требует такого связывания. Под влиянием β-каротина наблюдалось повышение экспрессии гена и индукции апоптоза в культуре 3 линий опухолевых (лейкемических) клеток. Считают, что β-каротин может усиливать апоптоз путем модулирования экспрессии регуляторных генов [56]. На пролиферацию и дифференцировку опухолевых клеток β-каротин в отличие от ретиноидов не влиял и цитостатическим действием в исследованных дозах не обладал [56].

Каротиноиды участвуют также в модулировании энзиматической активности, в частности, индуцируют детоксицирующие функции цитохром-450-зависимых монооксигеназ. Они способны регулировать многие ферментативные процессы в организме и обеспечивать важные биологические функции, касающиеся профилактики хронических, дегенеративных заболеваний и улучшения здоровья человека. Механизмы регуляции энзиматических процессов каротиноидами изучаются [55].

Заключение

Каротиноиды и их метаболиты (витамин А, ретиноиды и ретиновые кислоты) играют важнейшую роль в биологических системах, включая существование всех форм жизни, что обусловлено их уникальными особенностями. С одной стороны, каротиноиды нестабильны и очень быстро разрушаются в присутствии кислорода воздуха и света. С другой – в отсутствие дестабилизирующих факторов, при низком парциальном давлении кислорода (как в клетках и тканях живого организма), они высокостабильны и защищают клетки от вредных эндо- и экзофакторов. Каротиноиды были обнаружены даже в античных залежах [49].

Биологические функции каротиноидов в живой природе многообразны:

- способны поглощать свет и улавливать свободные радикалы, выполняя защитные антиоксидантные, радио- и фотопротекторные функции организма от радиационных, УФ, свободно-радикальных повреждений;
- в составе природной антиоксидантной защитной системы они предохраняют биомембраны клеток от оксидативного стресса; обладают пигментирующей способностью;
- проявляют А-витаминные свойства;
- участвуют в регуляции ферментативной активности клеток и их детоксикации;
- активируют и регулируют экспрессию генов коннексина-43, являющегося интегральным компонентом межклеточного взаимодействия, предохраняя неопластическую трансформацию клеток.

Препараты на основе каротиноидов перспективны для химиопрофилактики рака, снижения риска общей заболеваемости (в т.ч. онкологической, сердечно-сосудистой, инфекционной), а также для включения в схемы лечения больных различного профиля в качестве эффективных детоксикантов, модуляторов, антиоксидантов, генорегуляторов.

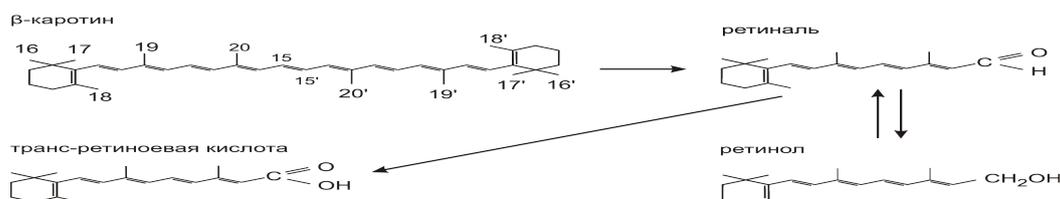


Рис. 3. Ферментативное превращение β-каротина в ретиналь.

Литература

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
2. Гаврилов А.С., Киселева А.И., Матушкина С.А. и др. Получение ликопина микробиологическим способом в условиях завода // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32, № 5. – С. 545–8.
3. Ивакин А.Ф., Феофилова Е.П. и др. Способ получения ликопина. Патент RU2102416. C09B61/00, 1998.
4. Ладыгин В.Г. Биосинтез каротиноидов в хлоропластах эукариотов // Журнал общ. биол. – 2002. – 63(4). – С. 299–325.
5. Машиковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Медицина, 1986. – Т. 2. – С. 3–5.
6. Сергеев А.В., Шапкина М.Я. Итоги и перспективы... // РБЖ. – 2006. – Т. 5, – № 3. – С. 103–11.
7. Спиричев В.Б. Дефицит микронутриентов и отечественные продукты... – М.: Валетек-продимпэкс, 1998. – 32 с.
8. Статистика злокачественных... // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2007. – Т. 18, № 2(1). – С. 90–2.
9. Атанасова В. Возможности использования ликопина и бета-каротина в профилактике колоректальной карциномы // Хранительна наука, техника и технологии. – 19–20 окт. 2007. – Пловдив. – С. 303–9.
10. Bendich A. Biological functions... // Carotenoids in Human Health in Ann. New York AS. – 1993. – Vol. 691. – P. 61–7.
11. Bertram J.S. Cancer Prevention by Carotenoids Mechanistic Studies in Cultured Cells // Carotenoids in Human Health in Ann. NY AS. – 1993. – V. 691. – P. 177–91.
12. Bertram J.S., Vine A.L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – Vol. 1740 (2). – P. 170–8.
13. Boileau T.W., Boileau A.C., Erdman J.W. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene // Exp. Biol. Med. – 2002. – Vol. 227(10). – P. 914–9.
14. Bowen P., Chen L., Stacewicz-Sapuntzakis M. et al. Tomato sause supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation... // Exp. Biol. Med. – 2002. – Vol. 227(10). – P. 886–93.
15. Bramley P.M. Regulation of carotenoid formation during... // J Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53(377). – P. 2107–13.
16. Clagett-Dame M., DeLuca H.F. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development // Annu Rev. Nutr. – 2002. – Vol. 22. – P. 347–81.
17. Cutler R.G. Carotenoids and retinol: their possible importance in determining longevity of primate species // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1984. – Vol. 81. – P. 7627–31.
18. Darlow B.A., Graham P.J. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birth.-weight infants // Cochrane Database Syst. Rev. – 2002. – (4): CD000501.
19. De Souza W.A., Da Costa Vilas Boas O.M. Vitamin A deficiency in Brazil: an overview // Rev. Panam. Salud Publica. – 2002. – Vol. 12(3). – P. 173–9.
20. De Souza R.M., D'Souza R. Vitamin A for preventing secondary infections in children with measles: a systematic review // J Trop. Pediatr. – 2002. – Vol. 48(2). – P. 72–7.
21. De Souza R.M., D'Souza R. Vitamin A for treating measles in children // Cochrane DB Syst. Rev. – 2002. – (1): CD001479.
22. De Souza R.M., D'Souza R. Vitamin A for the treatment of children with measles: a systematic review // J Trop. Pediatr. – 2002. – Vol. 48 (6). – P. 323–7.
23. Duggan C., Fawzi W. Micronutrients and child health: Studies in international nutrition and HIV infection // Nutr. Rev. – 2001. – Vol. 59 (11). – P. 358–69.

24. *Gust D., Moore T.A., Moore A.L. et al.* The Photochemistry of Carotenoids // Carotenoids in Human Health. in Ann. NY AS. – 1993. – Vol. 691. – P. 32–47.
25. *Hadley C.W., Miller E.C., Schwartz S.J. et al.* Tomatoes, lycopene and prostate cancer: progress and promise // Exp. Biol. Med. – 2002. – Vol. 227(10). – P. 869–80.
26. *Hammond B.R. Jr., Wooten B.R., Curran-Celentano J.* Carotenoids in the retina and lens: possible acute and chronic effects on human visual performance // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – Vol. 385(1). – P. 41–6.
27. *Handelman G.J.* The evolving role of carotenoids in human biochemistry // Nutrition. – 2001. – Vol. 17(10). – P. 818–22.
28. *Heber D., Lu Q.Y.* Overview of mechanisms of action of lycopene // Exp. Biol. Med. – 2002. – Vol. 227(10). – P. 920–3.
29. *Hirschberg J.* Carotenoids biosynthesis in flowering plants // Curr. Opin. Plant Biol. – 2001. – Vol. 4(3). – P. 210–8.
30. *Hix L.M., Lockwood S.F., Bertram J.S.* Bioactive carotenoids: potent antioxidants and regulators of gene expression // Redox Report. – 2004. – Vol. 9(4). – P. 181–91.
31. *Hu J., La Vecchia C., Negri E. et al.* Dietary vitamins C, E and carotenoid intake and risk of renal cell carcinoma // Epidem. Res. Group Cancer causes control, 2009, June 17, AMID 19533394.
32. International Agency for Research on Cancer (IARC). Handbooks of Cancer Prevention Carotenoids. – Lyon, France, 1998. – Vol. 2. – 326 p.
33. *Jeong N.H., Song E.S., Lee J.M. et al.* Plasma carotenoids, retinal and tocopherol levels and risk of ovarian cancer // Acta Obstet Gynecol. Scand. – 2009. – Vol. 88(4). – P. 457–62.
34. *Jewell V.C., Northrop-Clewes C.A., Tubman R. et al.* Nutritional factors and visual function in premature infants // Proc. Nutr. Soc. – 2001. – Vol. 60(2). – P. 171–8.
35. *Johnson E.J., Qin J., Krinsky N.I. et al.* Ingestion by men of a combined dose of β -carotene and lycopene does not affect the absorption of β -carotene but improves that of lycopene // J Nutr. – 1997. – Vol. 127. – P. 1833–7.
36. *Kabat G.C., Kim M., Adams-Campbell L.L. et al.* Longitudinal study of serum carotenoid, retinal and tocopherol concentrations in relation to breast cancer risk among postmenstrual woman // Am.J.Clin. – 2009. – Vol. 90(1). – P. 162–9.
37. *Klipstein-Grobusch K., Launer L.J., Geleijnse J.M. et al.* Serum carotenoids and atherosclerosis. The Rotterdam Study // Medline® 2000/01-2000/04. – Atherosclerosis. – 2000. – Vol. 148(1). – P. 49–56.
38. *Landrum J.T., Bone R.A.* Lutein zeaxanthin and macular pigment // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – Vol. 385(1). – P. 28–40.
39. *von Lintig J., Wyss A.* Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterization of beta-carotene 15, 15'-dioxygenases // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – Vol. 385(1). – P. 47–52.
40. *Liu G.N., Zhu Y.H., Jang J.C.* The metabolomics of carotenoids in engineered cell factory // Appl. Microbiol Biotechnol. – 2009. – Vol. 83(6). – P. 989–99.
41. *Livera G., Rouiller-Fabre V., Pairault C. et al.* Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A // Reproduction. – 2002. – Vol. 124(2). – P. 173–80.
42. *Mares-Perlman J.A., Millen A.E., Ficek T.L. et al.* The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview // J Nutr. – 2002. – Vol. 132(3). – P. 518s–524s.
43. *Marill J., Idres N., Capron C.C. et al.* Retinoic acid metabolism... // Curr. Drug. Metab. – 2003. – Vol. 4(1). – P. 1–10.
44. *McBee J.K., Palczewski K., Baehr W. et al.* Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina // Prog. Retin. Eye Res. – 2001. – Vol. 20(4). – P. 469–529.
45. *Mehta K.* Retinoic acid: a player that rules the game... // Indian J Exp. Biol. – 2002. – Vol. 40(8). – P. 874–81.
46. *Mortensen A., Skibsted L.H., Truscott T.G.* The interaction of dietary... // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – Vol. 385(1). – P. 13–9.
47. *Noakes M., Clifton P., Ntanos F. et al.* An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations // Am. J Clin. Nutr. – 2002. – Vol. 75(1). – P. 79–86.
48. *Ntanos F.Y., Duchateau G.S.* A healthy diet rich in carotenoids is effective in maintaining normal blood carotenoid levels during the daily use of plant sterol-enriched spreads // Int. J Vitam. Nutr. Res. – 2002. – Vol. 72(1). – P. 32–9.
49. *Olson J.A.* Molecular Actions of carotenoids // Carotenoids in Human Health in Ann NY AS. – 1993. – Vol. 691. – P. 156–66.
50. *Pattison D.J., Symmons D.P., Lunt M. et al.* Dietary beta-cryptoxanthin and inflammatory polyarthritis: results from a population-based prospective study // Am. J Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 82(2). – P. 451–5.
51. *Pauleikhoff D., van Kuijk F.J., Bird A.C.* Macular pigment... // Ophthalmologie. – 2001. – Vol. 98(6). – P. 511–9.
52. *Rao A.V.* Lycopene, tomatoes and the prevention... // Exp. Biol. Med. – 2002. – Vol. 227(10). – P. 908–13.
53. *Reifen R.* Vitamin A as an anti-inflammatory agent // Proc. Nutr. Soc. – 2002. – Vol. 61(3). – P. 397–400.
54. *Ribaya-Mercado J.D.* Influence of dietary fat on beta-carotene absorption and... // Nutr. Rev. – 2002. – Vol. 60(4). – P. 104–10.
55. *Ruhl R.* Induction of PXR-mediated metabolism by beta-carotene // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – Vol. 1770(2). – P. 162–9.
56. *Sacha T., Zawada M., Hartwich J. et al.* The effect of beta-carotene and its derivatives on cytotoxicity, differentiation, proliferative potential and apoptosis on the three human acute leukemia cell lines: U-937, HL-60 and TF-1 // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – Vol. 1740(2). – P. 206–14.
57. *Sandmann G.* Carotenoid biosynthesis... // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – Vol. 385(1). – P. 4–12.
58. *Shaban H., Richter C.* A2E and blue light in the retina: the paradigm of age-related macular degeneration // Biol. Chem. – 2002. – Vol. 383(3–4). – P. 537–45.
59. *Shey W.I., Brocklehurst P., Sterne J.A.* Vitamin A supplementation for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection // Cochrane Database Syst. Rev. – 2002. – (3): CD003648.
60. *Siems W.G., Sommerburg O., van Kuijk F.J.* Lycopene and beta-carotene decompose more rapidly than lutein and zeaxanthin upon exposure to various pro-oxidants in vitro // Medline ® 2000/01-2000/04. – Biofactors. – 1999. – Vol. 10(2–3). – P. 105–13.
61. *Stahl W., Ale-Agha N., Polidori M.C.* Non-antioxidant properties of carotenoids // Biol. Chem. – 2002. – Vol. 383(3–4). – P. 553–8.
62. *Stahl W., Junghans A., de Boer B. et al.* Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of Lycopene and Lutein // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 427. – P. 305–8.
63. *Stahl W., Sies H.* Carotenoids and protection against... // Skin. Pharmacol. Appl. Skin Physiol. – 2002. – Vol. 15(5). – P. 291–6.
64. *Stoltzfus R.J., Humphrey J.H.* Vitamin A and the nursing mother-infant dyad: evidence for intervention // Adv. Exp. Med. Biol. – 2002. – Vol. 503. – P. 39–47.
65. *Tao J., Zhang S.L., Xu C.J. et al.* Gene and gene engineering... // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. – 2002. – Vol. 18(3). – P. 276–81.
66. *Tzimas G., Nau H.* The role of metabolism and toxicokinetics... // Curr. Pharm. Des. – 2001. – Vol. 7(9). – P. 803–31.
67. *Van D.E., Kulier R., Gulmezoglu A.M. et al.* Vitamin A supplementation during pregnancy // Cochrane Database Syst. Rev. – 2002. – (4): CD001996.
68. *Vine A.L., Bertram J.S.* Upregulation of connexin 43 by retinoids but not by Non-Provitamin A carotenoids requires RARs // J Nutr. Cancer. – 2005. – Vol. 52(1). – P. 105–13.
69. *Vliet T.V., Schaik F.V., Den Berg H.V. et al.* Effect of Vitamin A and beta-carotene intake on Dioxygenase Activity in rat Intestine // Carotenoids in Human Health in Ann. NY AS. – 1993. – Vol. 691. – P. 220–2.
70. *Weisburger J.H.* Lycopene and tomato products in health promotion // Exp. Biol. Med. – 2002. – Vol. 227(10). – P. 924–7.
71. *Weiser H., Kormann A.W.* Provitamin A activities... // Carotenoids in Human Health in. – Ann. NY AS. – 1993. – Vol. 691. – P. 213–5.
72. *Zile M.H.* Function of vitamin A in vertebrate embryonic development // J Nutr. – 2001. – Vol. 131(3). – P. 705–8.

УДК 616-006-085.831.011:577.352.2

Чан Тхи Хай Иен¹, Г.В. Раменская¹, Н.А. Оборотова²**ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ХЛОРИНОВОГО РЯДА В ФДТ ОПУХОЛЕЙ**¹ММА им. И.М. Сеченова, Москва²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация:**

Чан Тхи Хай Иен, аспирантка кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии фармацевтического факультета ММА им. И.М. Сеченова

адрес: 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр.2; тел. +7(965)-332-82-57**e-mail:** tran_yen234@mail.ru

Статья поступила 22.07.2009, принята к печати 27.10.2009.

Резюме

Фотосенсибилизаторы недавно и достаточно широко применяются в фотодинамической терапии при лечении опухолей, когда хирургическая операция невозможна из-за тяжелых сопутствующих заболеваний, значительной распространенности опухоли или косметической причины. Обзор посвящен обсуждению некоторых препаратов хлоринового ряда, которые применяются как фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии в России и за рубежом. Приводятся примеры изучения липосомальной формы на основе сложного эфира хлорина e_6 и мезо-тетра(гидрофенил) хлорина для повышения фотодинамической эффективности.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотосенсибилизаторы, хлорин e_6 , фоскан, липосомы.Tran Thi Hai Yen¹, G.V. Ramenskaya¹, N.A. Oborotova²**CHLORIN DERIVATIVES IN CANCER PHOTODYNAMIC THERAPY**¹I.M. Sechenov Moscow Medical Academy²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

Photosensitizers are widely used in cancer photodynamic therapy when surgical operation is not recommended because of serious concomitant diseases, significant prevalence of tumor or cosmetic causes. This review is devoted to discussion of chlorin derivatives' drugs which are in use as photosensitizers for PDT in Russia and abroad. A number of examples of liposomal formulation constructing based on chlorin ester and m-(THPC) for enhancing selectivity and PDT efficacy is presented.

Key words: photodynamic therapy, photosensitizers, chlorin e_6 , phoscan, liposomes.**Введение**

Фотодинамическая терапия является быстро развивающимся методом лечения опухолей, основанном на введении в организм специального препарата – фотосенсибилизатора и облучении лазерным излучением с длиной волны, соответствующей пику поглощения ФС.

Под действием света происходят фотохимические реакции между ФС и кислородом, приводящие к образованию в опухолевой ткани и/или в сосудах опухоли цитотоксических агентов (прежде всего активных форм кислорода), повреждающих структурные элементы опухоли.

ФС должен обладать следующими свойствами:

1. высокой селективностью накопления в опухоли,
2. интенсивным поглощением и флуоресценцией в красной и ближней ИК области спектра,
3. быстрым выведением из нормальных тканей,
4. слабым накоплением в коже,
5. устойчивостью при хранении [6; 16; 39].

Высокая селективность накопления ФС в опухоли минимизирует вероятность повреждения здоровых тканей при проведении ФДТ. По данным большинства исследователей [13; 24; 32; 64] селективность накопления ФС в опухоли по отношению к здоровой ткани может составлять от 2:1 до 15:1 в зависимости от типа ФС и гистологической структуры опухоли.

Традиционными фотодинамическими агентами первого поколения являются гематопорфирин и его производные (Фотофрин II – США), Фотогем (Россия). Недостатками этих ФС являются неоптимальный спектр поглощения (вблизи $\lambda=630$ нм), малая глубина проникновения света (3-5 мм), недостаточная избирательность накопления, длительное удерживание препаратов в здоровых тканях, сложный состав (Фотофрин содержит около 60 компонентов) [14; 53; 56]. В отличие от ФС первого поколения современные ФС активируются светом в длинноволновой красной области спектра ($\lambda=650-680$ нм), который глубже проникает в ткани, более избирательно накапливается в опухолевой ткани и быстрее выводится из организма [25; 40].

Среди ФС второго поколения известны и широко применяются в практике производные хлоринового ряда такие как Радахлорин (Рада-Фарма, Россия) и Фотодитазин (ООО «Вета-Гранд», Россия), Фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Белоруссия), Фоскан («Biolitec AG», Германия).

Фотодитазин

Фотодитазин (Fotoditazin) разработан в компании ООО «Вета-Гранд» (Россия). Он представляет собой ди-N-метилглюкаминовую соль хлорина e_6 и является производным хлорофилла *a* [8; 55]. Фотодитазин получают из биомассы микроводоросли *Spirulina platensis* с выходом хлорина e_6 в количестве не менее 98 %.

Фотодитазин содержит хлорина e_6 , N-метил-D-глюкамин в мольном соотношении 1:2 и поливинилпирролидон с молярным весом от 9 600 до 11 500 (т.е. в р-ре препарата находится ди-N-метилглюкаминная соль хлорина e_6) [9]. Лекарственной формой фотодитазина является концентрат для приготовления раствора для инфузий 5 мг/мл, расфасованный по 10 мл во флаконы из темного стекла, зарегистрирован в 2006 г., применяется для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики (ФД) рака кожи (плоскоклеточный, базальноклеточный), рака легкого. Фотодитазин быстро накапливается в опухоли, максимум накопления наступает через 2–3 ч [4] и через 2 суток 98 % препарата выводится из организма [9].

Фотодитазин обладает высокой фотодинамической активностью и имеет ряд преимуществ над другими препаратами производных хлорина e_6 :

- высокий коэффициент селективности накопления в опухоли по отношению к окружающей нормальной ткани равный 10, тогда как радахлорин и фотолон – 6 и 4 соответственно [9; 11; 61];
- высокий квантовый выход вследствие мономерности, гидрофильности и гомогенности, что обеспечивает высокую степень фототоксичности [9];
- способность связываться с мембранами опухолевых клеток [15];
- меньшая терапевтическая доза (0,3–1,5 мг/кг веса больного), чем радахлорин (0,5–2,4 мг/кг) и фотолон (2,5–3,0 мг/кг).

Результаты клинических испытаний по оценке эффективности ФДТ с использованием фотодитазина опубликованы в статьях [2; 7; 13; 17]. Эффективность фотодинамической терапии 127 пациентов с базальноклеточным раком кожи (БКРК) составила 100 %, при этом полная регрессия опухоли наступила у 118 (92,9 %) больных, а частичная – у 9 (7,1 %), абсолютная резистентность опухоли к препарату не обнаружена [13]. Кроме того, косметические результаты ФДТ превосходят таковые при традиционных методах лечения БКРК (хирургическом, лучевом, криодеструкции). Для того, чтобы избежать побочных реакций, осложнений и необходимости соблюдения светового режима, при лечении БКРК начальных стадий применяли внутритканевую и аппликационный способ введения фотодитазина [17]. Эффективность ФДТ при БКРК начальных стадий с внутритканевым введением препарата составляет 100 %, при этом полная регрессия достигнута у 76,2 %, частичная регрессия – 23,8 % и все пациенты с полной регрессией наблюдаются без рецидива 4–5 лет. А эффективность ФДТ БКРК начальных стадий после аппликации геля с фотодитазинном составляет 84,6 %. ФДТ с помощью фотодитазина является незаменимым методом лечения БКРК при «неудобных» локализациях опухолей (ушная раковина, угол глаза, веки, нос и др.).

Компания «Вета-гранд» выпускает новую лекарственную форму фотодитазина в виде 0,5%-ного геля-пенетратора, который, по мнению разработчиков, может быть перспективным для наружного применения при лечении гнойных длительно не заживающих ран и трофических язв; базальноклеточного, плоскоклеточного рака и кератозов кожи; фоновых и предраковых заболеваний влажной и шейки матки; заболеваний пародонта; псориаза и дерматозов.

Радахлорин

Радахлорин (Radachlorin) разработан в компании «Рада-Фарма» (Россия) и в отличие от фотодита-

зина представляет собой модифицированную природную смесь хлоринов из микроводоросли рода *Spirulina*. Субстанция радахлорина представляет собой 7%-ный водный раствор (жидкий экстракт хлоринов), содержащий натриевые соли: хлорина e_6 – 80–90 %, пурпурина-5 – 5–20 % и пурпурина-18, который в щелочной среде постепенно превращается в хлорин r_6 [11]. Хлорин e_6 обладает выраженной водорастворимостью и является солубилизирующим средством для двух более гидрофобных хлоринов, что улучшает стабильность препарата при хранении. Если субстанция содержит менее 5 % пурпурина-5, она имеет низкую биологическую активность. Водорастворимость субстанции, содержащей более 20 % пурпурина-5, ухудшается, что неблагоприятно сказывается на стабильности лекарственных форм при хранении и ухудшает способность к фильтрации через микропористые фильтры [11]. Радахлорин является смесью хлорина e_6 и более гидрофобных компонентов, что может повысить эффективность воздействия на опухоль [34]. Однако смесь веществ затрудняет фармацевтическую стандартизацию препарата.

Компания «Рада-Фарма» выпускает различные лекарственные формы радахлорина: раствор для внутривенного введения 0,35% и гель «Радахлорин» для наружного применения [10]. При внутривенном введении радахлорина в организм в дозе 0,5–2,4 мг/кг максимум его накопления в опухоли наблюдается через 2–3 ч, также как и для фотодитазина, 98 % радахлорина выводится из организма или метаболизируется в течение первых 48 ч. В 2005 г. радахлорин рекомендован для флуоресцентной диагностики рака кожи и для ФДТ поверхностных опухолей кожи (исключая меланому). В настоящее время проходит II фаза клинических испытаний препарата в отоларингологии и офтальмологии [12].

Фотолон

Фотолон (Photolon, Fotolon) разработан в фармацевтической компании «Белмедпрепараты» (Республика Беларусь) [61] и запатентован в 2003 г. Фотолон изначально получали из крапивы, он содержит производные хлорофиллов *a* и *b*. Поскольку в литературе не имеется сведений о химическом составе фотолон, можно предположить, что он содержит смесь, подобную хлорофиллу *e* из люцерны, описанному E. Snyder et E. Allen [19; 64]. Эта смесь могла содержать более 15 производных хлорофиллового ряда, что обуславливало ее низкую химическую стойкость и снижение растворимости в воде при хранении лиофилизированной формы, и вызывала необходимость применения высоких терапевтических доз фотолон (3–5 мг/кг). В настоящее время фотолон получают из цианобактерий рода *Spirulina*, что сокращает число возможных примесей (без производных ряда хлорофилла *b*), повышает чистоту препарата до 90 % [1] и уменьшает терапевтическую дозу до 2,5–3 мг/кг. Как и радахлорин, фотолон не является индивидуальным веществом (смесь компонентов в фотолоне затрудняет фармацевтическую стандартизацию препарата [41]). Петров П.Т и соавт. (РПУ «Белмедпрепараты») стабилизировали фотолон водорастворимым полимером поливинилпирролидоном с целью повышения водорастворимости лиофильно-высушенной формы препарата и предотвращения процесса агрегации, что повышает квантовый выход, и увеличивает противопухольную активность препарата [61].

Таким образом, препарат представляет собой фармацевтическую композицию на основе натриевой соли хлорина e_6 и ПВП в соотношении компонентов (масс. %): хлорин e_6 – 40–90, ПВП-10 – 60 [60; 61].

Оценке эффективности доставки фотолон в опухоль и эффективности ФДТ с помощью данного препарата посвящено множество исследований [27; 36; 44; 46; 48; 50; 59; 60; 61]. Исследования группы Н.А. Isakau показали, что в растворе ПВП взаимодействует с хлорином e_6 и образует молекулярные комплексы «хлорин e_6 -ПВП» [45; 59]. Они доказали, что взаимодействие хлорина e_6 с ПВП препятствует агрегации хлорина e_6 в водной среде, гидролизу соли хлорина e_6 , а также улучшает растворимость более гидрофобных сложных эфиров хлорина e_6 в водной среде. Одновременно фотофизические эксперименты с растворами хлорина e_6 и комплекса «хлорин e_6 -ПВП» показали, что связанные с ПВП молекулы хлорина e_6 имеют повышенную фотодинамическую активность и флуоресценцию по сравнению с одним хлорином e_6 [26; 44].

Комплекс «хлорин e_6 -ПВП» повышает его стабильность и растворимость в воде, следовательно, улучшает биодоступность и фотосенсибилизирующий эффект [28]. Кроме того, присоединение хлорина e_6 к полимеру увеличивает время циркуляции препарата в крови за счет повышения его молекулярной массы [49]. Это способствует пассивной доставке лекарственного соединения в опухоль с помощью «EPR»-эффекта [35], который основан на большей проницаемости сосудов опухоли, чем сосудов здоровых тканей, поэтому циркулирующий препарат легче диффундирует в опухолевую ткань [35], что объясняет более высокую селективность накопления фотолон в злокачественных опухолях по сравнению с хлорином e_6 [28; 29; 57].

После в/в введения фотолон максимальное количество препарата в опухоли регистрируются через 3 ч, затем концентрация активного вещества медленно снижается; через 24 ч в крови обнаруживаются следовые количества препарата.

Фотолон был зарегистрирован в РФ в 2004 г. в виде лиофилизата для приготовления раствора для инфузий по 25; 50 или 100 мг во флаконе или бутылке для кровезаменителей. Препарат применяется для ФДТ злокачественных новообразований, включая рак кожи (плоскоклеточный и базальноклеточный), РМЖ и их внутрикожные метастазы, рак слизистых оболочек (вульвы, пищевода, прямой кишки и др.) а также для диагностики злокачественных новообразований спектрофлуоресцентным методом.

Фоскан

Субстанция фоскана (компания Biolitec AG, Germany) – мезо-тетра-(гидрофенил)-хлорина (m-THPC), который первоначально был синтезирован R. Bonnett в Великобритании в 1989 г. [22]. Фоскан оказывался в 200 раз эффективнее, чем фотофрин II, поэтому его применяют в очень низкой дозе (0,15 мг/кг) при излучении света с низкой интенсивностью (30 Дж/см² по сравнению с 150 Дж/см² для препаратов хлорина e_6) [47]. В настоящее время фоскан является самым эффективным фотосенсибилизатором [33], обладает высокой избирательностью накопления в опухоли, индекс селективности составляет 10,4 по мышечной ткани и 4,1 по коже [47], и имеет большой квантовый выход [18; 49; 54]. В настоящее время фоскан разрешен в Европейском союзе для лечения опухолей шеи и головы [49], успешно применяется для лечения базально-клеточного рака [21], рака простаты [52] и поджелудочной железы [23]. Фоскан представляет собой раствор для инъекций с концентрацией действующего вещества темпорфина I и 4 мг/мл. Препарат является гидрофобным веществом, поэтому перед внутривенным введением его необходимо растворять

в смеси полиэтиленгликоль-400 : этанол : вода (3:2:5 по объему). Недостатком фоскана является медленная скорость выведения из организма (2 нед. после внутривенной инъекции по сравнению с 2–3 днями для препаратов производных хлорина e_6), что вызывает фототоксичность кожи. В практике интервал между введением препарата и обучением света для фоскана составляет 96 ч.

Липосомальная лекарственная форма фотосенсибилизаторов хлоринного ряда

Использование липосом для транспорта и целенаправленной доставки противоопухолевых препаратов – ФС является одним из перспективных направлений в ФДТ [20]. Липосомы представляют собой сферические везикулы – наночастицы, в которых водная фаза окружена одной или несколькими бислойными мембранами, построенными из фосфолипидных молекул (например, фосфатидилхолина) [3; 5; 20; 37]. Кроме липидов в состав липосом входят холестерин, повышающий стабильность везикул, и пэгированный липид, увеличивающий время циркуляции везикул в кровотоке [5; 20; 31; 62].

Липосомы могут быть использованы для солюбилизации гидрофобных ФС, что обеспечивает возможность их доклинического и клинического применения [63; 71]. Более того, исследования показывают, что инкапсуляция гидрофобных фотосенсибилизаторов в липосомы не только облегчает их введение *in vivo*, но и улучшает их фототоксичность [65; 66; 73] и фармакокинетический профиль [20; 38; 43; 67; 70; 72]. Очень важными направлениями использования липосом в ФДТ являются повышение биодоступности ФС в опухолевые ткани и внутрь опухолевых клеток, изменение биораспределения препаратов (в первую очередь, повышение его доли, поступающей в опухоль).

Липосомы эфира хлорина e_6 в ФДТ РЖ

Yoshihisa Namiki et al. получали липосомы из триметилового эфира хлорина e_6 , дилауроил-фосфатидилхолина (DLPC), диолеилфосфатидилэтанолamina (DOPE) и дистеароилфосфэтаноламина-N-[полиэтиленгликоль₂₀₀₀] (PEG₂₀₀₀DSPE). Данные липосомы имели диаметр меньше 100 нм [42], что повышало стабильность везикул и эффективность их противоопухолевого действия [51].

Методом спектрофотометрии доказано, что липосомы, содержавшие триметиловый эфир хлорина e_6 , имели большую интенсивность поглощения в красной области спектра (соотношение интенсивности липосомы/хлорин e_6 -Na = 1,83:1), а длина волны, при которой наблюдался максимум поглощения липосом с эфиром хлорина e_6 , была больше, чем у хлорина e_6 -Na (для липосом – 668,8 нм, для хлорина e_6 -Na – 655 нм). Это объяснялось присутствием липида и эфира триметила хлорина e_6 в составе липосом. Максимум поглощения эфира триметила хлорина e_6 в красной области наблюдался при λ 672 нм. Большая интенсивность поглощения липосомальной формы ФС в красной области является преимуществом при лечении злокачественных опухолей, так как позволяет осуществить более глубокое взаимодействие, чем при терапии хлорином e_6 -Na. Yoshihisa Namiki et al. проводили сравнительную оценку фотодинамической активности липосом, содержавших триметиловый эфир хлорина e_6 , и обычной тринатриевой соли хлорина e_6 на 9 клеточных линиях рака желудка человека. Обнаружено, что фототоксический эффект липосом, содержавших сложный эфир хлорина e_6 , был в 53 раза выше, чем у хлорина e_6 -Na [73].

Накопление препаратов в клетках в экспериментах *in vitro* изучался с помощью флуоресцентной микроскопии. При равных концентрациях сравниваемых препаратов только липосомы накапливались внутри клеток, и это было характерно для всех клеточных линий [73]. Фототоксичность липосом для каждой клеточной линии зависела от интенсивности внутриклеточной флуоресценции. Полученные результаты показали, что фототоксичность липосом, содержащих сложный эфир хлорина e_6 , повышалась благодаря увеличению накопления везикул в клетках и оптимальным спектральным характеристикам. Таким образом, липосомы, содержащие триметиловый эфир хлорина e_6 , могут быть перспективными для фотодинамической терапии рака желудка.

Липосомальный препарат Фослип

В последнее время создано много липосомальных форм *m*-ТНРС (фоскана), лучше всего исследован Фослип. Фослип (Foslip) – непэгиллированные липосомы *m*-ТНРС, липидная мембрана которых состоит двух липидов – дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) и дипальмитоилфосфатидилглицерина (DPPG) в соотношении 9:1. Пэгиллированные липосомы *m*-ТНРС названы Фоспег (Fospeg). Липосомы предотвращают агрегацию *m*-ТНРС в водной среде и позволяют создать лекарственную форму, пригодную для внутривенного введения.

Henri-Pierre Lassalle et al. в исследованиях *in vivo* показали, что липосомальная форма *m*-ТНРС выводится из организма в 3 раза быстрее, чем Фоскан (период полувыведения 82,5 и 35,7 ч. соответственно [43; 47]). Максимальная концентрация препарата в опухоли наблюдается через 24–48 ч после введения фоскана [30; 47; 58], а при введении фослипа концентрация *m*-ТНРС достигает плато уже через 6–15 ч после инъекции [43], т.е. Фослип быстрее распределяется в опухоли.

Литература

1. Альбицкая О.Н., Ашмаров В.В., Мещерякова А.Л. Способ получения 18-карбоксо-20-(карбоксиметил)-8-этил-13-этил-2,3-дигидро-3,7,12,17-тетраметил-21Н, 23Н-порфин-2-пропионовой кислоты или ее солей. Патент РФ №2054476 от 20 февраля 1996 г.
2. Бобров А.П., Бадмаева А.Н., Кузнецов А.В. Применение фотодитазина при лечении воспалительных заболеваний пародонта, вызванных зубными протезами // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 44–6.
3. Дудниченко А.С. Новые возможности в лечении рака // Провизор. – 2000. – № 6. – С. 18–9.
4. Загайнова Е.В., Ширманова М.В., Сироткина М.А. и др. Мониторинг накопления фотосенсибилизаторов в опухоли методом диффузионной и флуоресцентной томографии // РБЖ. – 2008. – Т. 7, № 4. – С.30–5.
5. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 3–8.
6. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соросовский Образовательный Жур. – 1996. – №8. – С. 32–40.
7. Отдельнова О.Б., Хашукова А.З., Ибрагимова М.И. Возможность фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора фотодитазин в лечении гинекологических заболеваний // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 47–52.
8. Пономарев Г.В., Решетников А.В., Гусева-Донская Т.Н. и др. Способ получения водорастворимых хлоринов. – Патент РФ № 2144538. от 20 января 2000 г.
9. Пономарев Г.В., Тавровский Л.Д., Зарецкий А.М. и др. Фотосенсибилизатор и способ его получения. – Патент РФ №2276976 от 27 мая 2006 г.
10. Решетников А.В., Карменян А.В., Абакумова О.Ю. и др. Оценка биологической и противоопухолевой активности нового фотосенсибилизатора для клинического исследования – Радахлорина, 0,35%-го раствора для внутривенного введения. URL : <http://www.milon.ru/index.phtml?tid=113> (дата обращения 17.06.2009)
11. Решетников А.В., Залевский И.Д., Кемов Ю.В. и др. Фотосенсибилизатор и способ его получения. Патент РФ №2183956 от 21 декабря 2001 г. United States Patent US 6,969,765 of Nov.29, 2005.
12. Решетников А.В. Фотосенсибилизаторы в современной клинической практике // Материалы научно-практической конференции оториноларингологов ЦФО РФ «Лазерные технологии в оториноларингологии» Под ред. В.Г. Зенгера и А.Н. Наседкина, Тула 26–28 сентября, 2007 г.

Максимальный коэффициент контрастности между опухолевой и мышечной тканями достигается в интервале 6–15 ч после инъекции фослипа, что намного быстрее, чем для фоскана [58; 68; 69]. Показано, что оптимальный интервал между введением препарата и облучением света составляет 6 часов, при этом препарат уже находится в опухолевых и эндотелиальных клетках сосудов, что способствует оптимальной ФДТ. Таким образом, Фослип повышает эффективность ФДТ, уменьшает повреждение окружающих тканей и время госпитализации больных. Фослип может стать эффективным альтернативным препаратом фотосенсибилизаторам хлоринового ряда.

Заключение

Таким образом, ФС хлоринового ряда обладают интенсивной полосой поглощения в длинноволновой области спектра, чему соответствует эффективная глубина проникновения света в ткани. Высокая скорость распределения и накопления водорастворимых ФС производных хлорина e_6 в опухоли позволяет сократить интервал между введением препарата и облучением лазерного света. Высокая скорость выведения данных препаратов из организма позволяет исключить этап продолжительного стационарного лечения, не требует необходимости соблюдения светового режима.

Созданы новые липосомальные препараты на основе ФС: хлоринового ряда *m*-ТНРС и триметилового эфира хлорина e_6 . Включение липофильных ФС в липосомы позволяет избежать агрегации, повысить стабильность при хранении, селективность и эффективность ФДТ.

В ближайшем будущем можно ожидать новых экспериментальных и клинических исследований липосомальных препаратов на основе ФС хлоринового ряда.

13. Странадко Е.Ф., Мешков В.М., Рябов М.В., Маркичев Н.А. Использование фотобиологических свойств порфиринов в клинической онкологии // Материалы II всероссийского съезда фотобиологов. – Пущино, 1998. – С. 402–5.
14. Фотодинамическая диагностика при поверхностном раке мочевого пузыря // Актуальные вопросы урологии: материалы VI Белорусско-польского международного симпозиума, Витебск, 10–11 октября 2003г. – С. 50–2.
13. Фотодитазин. ООО «Вета-гранд». <http://www.fotoditazin.ru> (дата обращения 15 июня 2009)
14. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. и др. Скрининг и медико-биологическое изучение отечественных фотосенсибилизаторов // Росс. Хим. Журн. – 1998. – XLII, 5. – С. 17–23.
15. Ярославцева-Исаева Е.В., Каплан М.А. Эффективность фотодинамической терапии базально-клеточного рака кожи начальных стадий с локальным введением фотосенсибилизатора фотодитазин // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 36–41.
16. Alian W., Andersson-Engels S., Svanberg K., Svanberg S. Laserinduced fluorescence studies of meso-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in malignant and normal tissues in rats // Br. J. Cancer. – 1994. – Vol. 70. – P. 880–5.
17. Allen E.A. New porphyrinic and chlorophyllic compositions and process therefor. United State Patent US 3,102,891 of Sep 1963.
18. Annelies S.L., Peter A.M. de Witte. Liposomes for photodynamic therapy // Advanced drug delivery reviews. – 2004. – Vol. 56. – P. 17–30.
19. Baas P., Saarnak A.E., Oppelaar H. et al. Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study // Br. J. Dermatol. – 2001. – Vol. 145(1). – P. 75–8.
20. Bonnet R., Berenbaum M.C. Porphyrins nad cancer treatment. United State Patent US 5162519 of Nov 10, 1992.
21. Bown S.G., Rogowska A.Z., Whitelaw D.E. et al. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas // Gut. – 2002. – Vol. 50(4) – P. 549–57.
22. Boyle R.W., Dolphin D.H. Structure and Biodistribution Relationships of Photodynamic Sensitizers (Invited Review) // Photochem. Photobiol. – 1996. – Vol. 64(3). – P. 469–85.
23. Brandis A., Salomon Y., Scherz A. Bacteriochlorophyll sensitizers in photodynamic therapy. In: Grimm B., Porra R.J., Rudiger W. and Scheer H. (eds.) Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics and Biological Functions. – Dordrecht, NL, Kluwer, 2005. – P. 461–82.
24. Chadha R., Jain D.V.S., Aggarwal A. et al. Binding constants of inclusion complexes of nitroimidazoles with β -cyclodextrins in the absence and presence of PVP // Thermochim. Acta. – 2007. – Vol. 459. – P. 111–5.
25. Chin W.L.L., Lau W.K.O., Bhuvanewari R. et al. Chlorin e6-polyvinylpyrrolidone as a fluorescent marker for fluorescence diagnosis of human bladder cancer implanted on the chick chorioallantoic membrane model // Cancer Lett. – 2007. – Vol. 245. – P. 127–33.
26. Chin W.W., Heng P.W., Bhuvanewari R. et al. The potential application of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone formulation in photodynamic therapy // Photochem. Photobiol. Sci. – 2006. – № 5. – P. 1031–7.
27. Chin W.W.L., Lau W.K.O., Heng P.W.S. et al. Fluorescence imaging and phototoxicity effects of new formulation of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone // J. Photochem. Photobiol. – 2006. – Vol. 84. – P. 103–10.
28. Cramers P., Ruevekamp M., Oppelaar H. et al. Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy // Br. J. Cancer. – 2003. – Vol. 88(2). – P. 283–90.
29. Dev Kumar Chatterjee, Li Shan Fong, Yong Zhang. Nanoparticles in photodynamic therapy : An emerging paradigm // Adv. Drug Del. Rev. – 2008. – Vol. 60. – P. 1627–37.
30. Dougherty T.J. Photoradiation therapy for cutaneous and subcutaneous malignancies // J. Invest. Dermatol. – 1981. – Vol. 77. – P. 122–4.
31. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W. et al. Photodynamic therapy // J.Natl. Cancer Inst. – 1998. – Vol. 90. – P. 889–905.
32. Douillard S., Olivier D., Patrice T. In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin(R) sensitizer for photodynamic therapy // Photochem. Photobiol. Sci. – 2009. – Vol. 8(3) – P. 405–13.
33. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics // Nat. Rev. Drug Discov. – 2003. – Vol. 2. – P. 347–60.
34. Fotolon[®]: Nonclinical Summary (Synopsis), RUE Belmedpreparaty, Minsk, 2003; or Fotolon[™]: Nonclinical Summary (Synopsis). HAEMATO-science GmbH, Germany. Version: 5.10.2003.
35. Francis Puisieux, Patrick Couvreur, Jacques Delattre and Jean-Pjilippe Devissaguet. Liposome, new systems and new trends in their application. Editions de Sante, 1995. – 797 p.
36. Gijsens A., Derycke A., Missiaed L. et al. Targeting of the photocytotoxic compound ALPcS4 to Hela cells by transferrin conjugated PEG-liposomes // Int. J. Cancer. – 2002. – Vol. 101. – P. 78–85.
37. Gradyushko A.T., Sevchenko A.N., Solovyov K.N., Tsvirko. M.P. Energtics of photophysical processes in chlorophyll- like molecules // Photochem. Photobiol. – 1970. – Vol. 11. – P. 387–400.
38. Halina Mojzisoava, Stephanie Bonneau, Christine Vever-Bizet, Daniel Brault. The pH – dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes : A physico-chemical approach // Biochem. Biophys. Acta. – 2007. – Vol. 1768. – P. 366–74.
39. Halina Podbielska, Agnieszka Ulatowska-Jarza, Gerhard Muller et al. Silica sol-gel matrix doped with Photolon molecules for sensing and medical therapy purpose // Biomolecular Engineering. – 2007. – Vol. 24. – P. 425–33.
40. Hashizume H., Baluk P., Morikawa S. et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness // Am. J. Pathol. – 2000. – Vol. 156. – P. 1363–80.
41. Henri-Pierre Lassalle, Dominique Dumas, Susanna Grafe et al. Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC // J. Contr. Release. – 2009. – Vol. 134. – P. 118–24.
42. Isakau H.A., Parkhats M.V., Knyuksho V.N. et al. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer-polymer interaction in vitro // J. Photochem. Photobiol. B : Biol. – 2008. – Vol. 92. – P. 165–74.

45. *Isakau H.A., Trukhacheva T.V., Petrov P.T.* Isolation and identification of impurities in chlorin e6 // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 45. – P. 20–9.
46. *Istomin Y.P., Laptsevich T.P., Bizyuk S.A. et al.* Photodynamic efficacy of topical application of chlorin e6 – Polyvinylpyrrolidone complex in tumor-bearing rats // *Exp. Oncol.* – 2006. – Vol. 28(4). – P. 299–302.
47. *Jones H.J., Veron D.J., Brown S.B.* Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics // *Cancer Res. UK.* – 2003. – Vol. 89. – P. 398–404.
48. *Kaneda Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y et al.* The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25. – P. 3259–66.
49. *Kostron H.* Photodynamic treatment of malignant brain tumors. In: Spinelli P, Dal Fante M, Marchesini R, eds. *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers.* Excerpta Medica, 1992. – P. 386–90.
50. *Louise Copley, Pauline van der Watt, Karel W. Wirtz et al.* Photolon™, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis // *Internat. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 40. – P. 227–35.
51. *Matsumura Y. and Maeda H.* A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46. – P. 6387–92.
52. *Moore C.M., Nathan T.R., Lees W.R. et al.* Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer // *Lasers Surg. Med.* – 2006. – Vol. 38(5). – P. 356–63.
53. *Nseyo U.O., Shumaker B., Klein E.A.* Photodynamic therapy using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transitional cell carcinoma in situ of the bladder // *J. Urol.* – 1998. – Vol. 160(1). – P. 39–44.
54. *Obwegeser A., Jakober R., Kostron H.* Uptake and kinetics of ¹⁴C labelled meta-tetrahydroxyphenylchlorin and 5-aminolevulinic acid in the C6 rat glioma model // *Br. J. Cancer.* – 1998. – Vol. 78. – P. 733–8.
55. *Ol'shevskaya Valentina A., Nikitina Roza G., Savchenko Arina N. et al.* Novel boronated chlorin e6 – based photosensitizers : syntheses, binding to albumin and antitumour efficacy // *Bioorganic & Med. Chem.* – 2009. – Vol. 17. – P. 1297–306.
56. *Pandey R.K., Sumlin A.B., Constantine S. et al.* // *Photochem. and Photobiol.* – 1996. – Vol. 64(1). – P. 194–204.
57. *Parkhots M.V., Knyuksho V.N., Isakov G.A. et al.* Spectral-luminescent studies of the “Photolon” photosensitizer in model media and in blood of oncological patients // *J. Appl. Spectrosc.* – 2003. – Vol. 70. – P. 921–6.
58. *Peng Q., Moan J., Ma L.W., Nesland J.M.* Uptake, localization, and photodynamic effect of meso-tetra(hydroxyphenyl)porphine and its corresponding chlorin in normal and tumor tissues of mice bearing mammary carcinoma // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55. – P. 2620–6.
59. *Petrov P.T., Isakau H.A., Trukhacheva T.V. et al.* Agent for photodynamic diagnosis and treatment of oncological diseases. International Patent Application WO2004110438, 2004.
60. *Petrov P.T., Trukhacheva T., Isakov G.A. et al.* Photolon™ an agent for photodynamic diagnosis and therapy: non-clinical and clinical experience // *Acta Bioopt. Inform. Med.* – 2004. – Vol. 10. – P. 6–7.
61. *Petrov P.T., Tsarenkov V.M., Meshcheryakova A.P. et al.* Agent for photodynamic treatment of malignant tumors – photolon. Republic of Belarus Patent. 1999. № 5651.
62. Ricchelli F., Jori G. Spectroscopic studies on the intraliposomal distribution of porphyrins. In: *Photodynamic therapy of tumor and other diseases.* – Padova: Liberia Progetto, 1985. – P. 85–7.
63. *Sitnik T.M., Henderson B.W.* The effect of fluence rate on tumor and normal tissue responses to photodynamic therapy // *Photochem photobiol.* – 1998. – Vol. 67(4). – P. 462–6.
64. *Snyder E.G.* Preparation of chlorin e. US Patent A 2,274,101 (02/1942)
65. *Takeuchi H., Kojima H., Yamamoto H. and Kawashima Y.* Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats // *J. Control. Release.* – 2001. – Vol. 75. – P. 83–91.
66. *Vaage J., Mayhew E., Lasic D. and Martin F.* Therapy of primary and metastatic mouse mammary carcinomas with doxorubicin encapsulated in long circulating liposomes // *Int. J. Cancer.* – 1992. – Vol. 51. – P. 942–8.
67. *Venosa Di Gabriela, Hermida Laura, Batle Alcira et al.* Characterisation of liposomes containing aminolevulinic acid and derived esters // *J. of Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 2008. – № 92. – P. 1–9.
68. *Whelpton R., Michael-Titus A.T., Basra S.S., Grahn M.* Distribution of temoporfin, a new photosensitizer for the photodynamic therapy of cancer, in a murine tumor model // *Photochem Photobiol.* – 1995. – Vol. 61. – P. 397–401.
69. *Whelpton R., Michael-Titus A.T., Jamdar R.P. et al.* Distribution and excretion of radiolabeled temoporfin in a murine tumor model // *Photochem Photobiol.* – 1996. – Vol. 63. – P. 885–91.
70. *Wohrle D., Shopova M., Muller S. et al.* Liposome-delivered Zn(II)-2,3-naphthalocyanines as potential sensitizers for PDT : synthesis, photochemical, pharmacokinetic and phototherapeutic studies // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1993. – Vol. 21(2–3). – P. 155–65.
71. *Wyss P., Schwarz V., Dobler-Girdziunaite D. et al.* Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 93. – P. 720–4.
72. *Yasuyuki Sadzuka, Fumiaki Iwasaki, Ikumi Sugiyama et al.* Study on liposomalization of zinc-coproporphyrin I as a novel drug in photodynamic therapy // *Internat. J. Pharma.* – 2007. – Vol. 338. – P. 306–9.
73. *Yoshihisa Namiki, Tamami Namiki, Masataka Date et al.* Enhanced photodynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome // *Pharmacol. Res.* – 2004. – Vol. 50. – P. 65–76.

УДК 615.31

*В.И. Масычева, А.О. Белкина***ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕРМИДИНА
ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

Институт медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Контактная информация:

Масычева Валентина Ивановна, д-р биол. наук, профессор, директор института медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

адрес: 633010, Новосибирская область, г. Бердск-10, а/я 112; **тел.** +7(3841)-580-91**e-mail:** masycheva@ngs.ru

Статья поступила 28.09.2009, принята к печати 27.10.2009.

Резюме

При создании средств адресной доставки лекарств, нанопрепаратов и других биотерапевтических средств используются различные полимеры. Преимущество отдается тем, которые имеют эндогенное происхождение, биodeградируемы, малотоксичны, хорошо проникают в клетку. К таким полимерам относится биогенный полиамин спермидин. К настоящему времени накоплены сведения о роли спермидина в жизнедеятельности клетки, токсичности, о характере взаимодействия спермидина с нуклеиновыми кислотами, которые могут рассматриваться как обоснование для использования спермидина при конструировании биотерапевтических препаратов, для транспорта биологически активных веществ в клетки и ткани, в частности для стабилизации и доставки нуклеиновых кислот.

В обзоре представлены сведения о современных направлениях работ по конструированию и исследованию биопрепаратов, содержащих спермидин.

Ключевые слова: спермидин, биопрепараты, средства доставки лекарств, нанобиочастицы.*V. I. Masycheva, A.O. Belkina***THE PROSPECTS OF USING SPERMIDINE FOR CONSTRUCTION OF BIOPREPARATIONS**

Institute of Medical Biotechnology, FSRI SRC VB "VECTOR", Rospotrebnadsor

Abstract

Various polymers are used to develop vehicles for the addressed delivery of drugs, nanopreparations, and other biotherapeutic remedies. The preference should be given to those which have an endogenous origin, low toxicity, and high ability to penetrate into cells and to be biodegradable capacity. Biogenic polyamine, spermidine, possesses such properties. To date, a large amount of information is collected on the role of spermidine in cell viability, its toxicity, and the character of its interaction with nucleic acids. These data serve as the basis for the use of spermidine for designing the biotherapeutic preparations, for the delivery of biologically active compounds, in particular nucleic acids, into cells, and, for stabilization of nucleic acids.

The present review provides the information on the current status of the problem.

Key words: spermidine, nanoparticles, nanobiopreparations, drug delivery systems.**Введение**

Недостаточная эффективность многих медицинских препаратов может быть обусловлена рядом причин, в том числе – особенностью проницаемости для них клеточной мембраны и гистогематических барьеров, быстрой деградацией активной молекулы в цитоплазме или доставкой ее в лизосомальный компартмент, специализирующийся на процессах деградации. Перспективным направлением по преодолению этих недостатков является создание комплексных препаратов, объединяющих биологически активное вещество с полимерами, и молекулярных векторных конструкций, включающих транспортное средство (липосомы, мицеллы, дендримеры, вирусоподобные частицы и др.) с активной биологической субстанцией. Это позволяет создать препараты с контролируемым высвобождением действующего начала, использовать значительно меньшие количества биологически активного вещества для получения специфического эффекта и/или получить многократно увеличенный специфический эффект, изменить фармакокинетические характеристики, уменьшить токсический эффект препаратов, а также защитить биологически активное вещество от биodeградации.

Успех создания препаратов нового поколения в значительной степени зависит от выбора веществ, обеспечивающих транспорт лекарственного средства. В настоящее время сформулированы основные требования, которым должны удовлетворять вещества, используемые для транспорта лекарств. К ним можно отнести эндогенное происхождение, способность к биodeградации и быстрому выведению из организма, обеспечение транспорта через мембраны и тканевые барьеры, возможность переноса малых молекул, пептидов, белков и нуклеиновых кислот, низкую токсичность, отсутствие отдаленных последствий и т.д. С другой стороны, при выборе транспортных молекул необходимо иметь сведения о путях синтеза, распаде и выведения таких веществ из организма, о распределении по органам и тканям, наличии рецепторов и мишеней, об основных биологических свойствах. В совокупности эти данные позволят обеспечить целенаправленное создание лекарства с заданными свойствами. К веществам, удовлетворяющим этим требованиям, относится биогенный полиамин спермидин – природное соединение, содержащееся в тканях млекопитающих, в вирусах и микроорганизмах, во многих пищевых продуктах и обладающее рядом полезных биологических свойств.

В мире проводятся исследования его биологической активности – как в интересах фундаментальной науки, так и для оценки возможностей использования в медицине. Одним из перспективных направлений в фармацевтике является конструирование препаратов нуклеиновой природы, что находит отражение в разработке ДНК-содержащих средств для генной терапии, ДНК-вакцин, РНК-препаратов.

Большую роль в создании фармацевтических препаратов нуклеиновых кислот могут сыграть биогенные полиамины, в частности – спермидин, поскольку они являются хорошими переносчиками нуклеиновых кислот и других биологически активных (терапевтических) молекул в клетки.

Биохимические методы для определения содержания спермидина в препаратах, биологических жидкостях и тканях в настоящее время достаточно хорошо представлены, что значительно облегчает анализ препаратов, в состав которых входит спермидин, разработку документации на получение и контроль качества таких препаратов.

Эти данные могут рассматриваться как обоснование для использования спермидина для конструирования биотерапевтических препаратов, в том числе в качестве средства для транспорта биологически активных веществ, в частности – нуклеиновых кислот. Цель работы заключается в анализе накопленных сведений о молекулярно-биологических свойствах спермидина и подходах к его использованию при создании эффективных иммунобиологических препаратов.

Распространенность в биологических объектах

Биогенные полиамины широко распространены в природе. Они синтезируются многими микроорганизмами, вирусами, их обнаруживают во многих растительных и животных клетках [11; 21]. Предшественником спермидина является образующийся из аргинина орнитин. Орнитин под действием фермента орнитиндекарбоксилазы превращается в путресцин, из которого получается спермидин, являющийся предшественником спермина.

В клетках животных и человека спермидин находится во многих тканях в весьма заметных количествах. Спермидин и спермин локализованы в основном в ядре. Они входят в состав хроматина и участвуют в репликации ДНК, принимают участие в процессах пролиферации клеток и роста тканей, в регуляции синтеза белка. В сыворотке крови здоровых людей находится $2,5 \pm 0,3$ нмоль/мл, в моче – $4,5 \pm 0,16$ нмоль/мл, в белом веществе головного мозга 20 нг/мг спермидина [7], в спинномозговой жидкости содержание спермидина равно 110–190 пмоль/мл [43]. Спермидин содержится в довольно значительных количествах во многих продуктах питания, ежедневно употребляемых человеком. В кофе, яйцах, фруктах, овощах, мясе, сахаре, и др. – до 0,02–4 мг и более спермидина на 100 г продукта. Ежедневно человек потребляет от 0,143 до 0,285 мг спермидина, что равно 0,25–0,50 мг спермидин трихлорида [44]. В расщеплении спермина и спермидина участвует фермент диаминооксидаза (амилоридинаминоксидаза). Плазма крови резко снижает антибиотическое действие спермидина против бактерий за счет наличия в плазме крови сперминоксидазы.

Кроме того, в превращениях спермидина участвует ряд ферментов: ксантиндегидрогеназа, диаминацетилтрансферазы-1 и -2, орнитиндекарбоксилаза, сперминсинтаза, спермидинсинтаза [42]. Спермидин окисляется в 1,4-диаминобутан, который в заметных количествах экскретируется с мочой.

Взаимодействие спермидина с нуклеиновыми кислотами

Модуляция клеточных функций полиаминами хорошо изучена [21]. Полиамины играют существенную роль в росте клетки благодаря эффектам на уровне транскрипции и трансляции, модулируют функции ДНК, нуклеозидтрифосфатов, белков и особенно РНК. Они влияют на белковый синтез, стимулируя сборку 30S рибосомальных субъединиц, на деградацию и аминокислотирование РНК [19; 20; 22], фосфорилирование белков, на превращение В формы ДНК в Z-форму, на прогрессию клеточного цикла, апоптоз и функцию ионных каналов. Они обладают также способностью тормозить активность ряда ферментов – протеинкиназ, орнитиндекарбоксилазы [42]. Природные полиамины (путресцин, спермидин и спермин) способны к самосборке в стимулирующем физиологическом окружении в агрегаты, которые взаимодействуют с геномной ДНК и защищают ее от деградации нуклеазами [15].

Полиамины найдены, в основном, в виде полиамин-РНК комплексов (в печени крысы, лимфоцитах быка, в *E. coli* и др). Спермидин прочно связывается и с ДНК и может способствовать стабилизации ее двуспиральной структуры. С АТФ спермидин также образует комплексы [29]. Так, содержание связанного с ДНК, РНК, фосфолипидами и АТФ спермидина в лимфоцитах барана составляет 12,8 %; 57,2 %; 3,0 % и 12 %, а в клетках *E. coli* – 5,1 %; 89,7 %; 0,7 % и 0,7 %, соответственно.

Из этих данных видно, что спермидин в клетках в большей степени связан с РНК, чем с ДНК. Показано, что в лимфоцитах барана связывается 0,46 моль спермидина на 100 моль фосфатов ДНК или АТФ, а в печени крысы этот показатель составляет 0,19 [21].

Положительно заряженные аминогруппы биогенных полиаминов взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатами нуклеиновых кислот, образуя мостики между полинуклеотидными цепями или между смежными фосфатными группами в одной цепи. Deng N. et. al. [14] исследовали с помощью метода Рамановской спектроскопии связывание полиаминов с ДНК. Они показали, что спермидин и спермин взаимодействует с фосфатами не зависимо от состава оснований ДНК. Имеет место неспецифическое катионное связывание с локализацией полиаминов диффузно вдоль ДНК в соответствии с градиентом электростатического потенциала, перпендикулярно оси спирали ДНК. Слабая зависимость связывания полианионов с ДНК от состава основания в геноме предполагает, что состав последовательности играет вторичную роль в узнавании полиаминами ДНК. Спермидин является катионным полиамином с зарядом 3^+ , его избыток может привести к агрегации и преципитации ДНК [28]. Исследование с помощью Рамановской спектроскопии водных растворов 60 mM фосфатов ДНК (~20 мг ДНК/мл) и 1; 5 и 60 mM полиамина (т.е. с молярными соотношениями полиамин:фосфат 1:60, 1:12, 1:1) показало, что при низкой плотности полиамина (1:60, 1:12) геномная ДНК остается в растворе, а при соотношении 1:1 комплекс преципитирует [14]. Показано образование больших ДНК-агрегатов, индуцированных спермидином. Преципитация λ ДНК происходит в диапазоне концентрации спермидина 0,4–0,6 mM и концентрации λ ДНК 12–90 мкг/мл. Этот факт необходимо учитывать при конструировании средств доставки, включающих спермидин и (в качестве активного начала) нуклеиновые кислоты.

При изучении взаимодействия полиаминов с РНК и ДНК было показано, что связывание спермидина с РНК, содержащими двуцепочечные участки (поли АУ, поли ГЦ и рибосомальная РНК), было практически одинаковым, т.е. не наблюдалось зависимости от состава оснований. Среди одноцепочечных РНК предпочтительное связывание спермина убывало в ряду: полиУ > полиЦ > полиА. В присутствии 2мМ К⁺ и 100мМ Mg²⁺ связывание спермина с РНК было гораздо выше, чем с ДНК. При изучении связывания спермина с 16S рибосомальной РНК и 30S рибосомальными субъединицами разницы в связывании не наблюдалось, что свидетельствует, по мнению авторов, о том, что присутствие рибосомальных белков не влияет на связывание спермина с рибосомальной РНК [22]. Установлено, что полиамины оказывают незначительное влияние на вторичную структуру ДНК [14].

С другой стороны показано, что полиамины вызывают структурные изменения петлевых участков РНК, что может лежать в основе стимуляции синтеза ряда белков, сборки 30S рибосомальных субъединиц и сплайсинга эукариотических пре-мРНК [20]. Так как многие виды РНК содержат петлевые области дсРНК, полагают, что влияние полиаминов на клеточный рост происходит вследствие стабилизации вторичной структуры РНК путем связывания полиаминов с петлевыми участками. Данные о том, что спермидин и спермин ингибируют транскрипцию реовируса млекопитающих (MRV) могут быть объяснены тем, что геном этого вируса содержит 10 сегментов дсРНК, с которыми полиамины могут связываться, увеличивать стабильность дуплексных участков РНК [13] и нарушать тем самым транскрипцию.

Фармако-токсикологические исследования

Метаболизм полиаминов может играть доминантную роль в ответе организма на лекарства, стрессовую стимуляцию, вносить вклад в этиологию различных патологических состояний, включая рак. Дисрегуляция полиаминового катаболизма часто сопровождается различными патологическими состояниями, и, возможно, включена в механизм заболевания. Так, показано изменение уровня полиаминов в крови у пациентов с панкреатитом [24]. При шизофрении резко возрастает уровень секреции и выведения полиаминов с мочой [7]. Обнаружено увеличение количества акролеина, продукта превращения полиаминов с помощью полиаминоксидазы, при хронических нарушениях функции почек или инсульте мозга. В нормальных условиях акролеин незначительно продуцируется в клетках, поскольку полиамины существуют в виде РНК-полиаминовых комплексов, а не в свободной форме. Igarashi K. et al. предположили, что акролеин начинает эффективно продуцироваться, если клетки повреждены и разрушен комплекс РНК-полиамин. Поэтому изменение уровня акролеина может оказаться хорошим маркером патологий, которые сопровождаются повреждением клеток [21]. Обнаружено увеличение количества полиаминов в период деления клеток. Содержание полиаминов увеличено в опухолевых и пролиферирующих клетках. Этот факт привлекает внимание ученых также с точки зрения изучения возможности ингибирования клеточного роста путем воздействия на синтез полиаминов в клетках. Поэтому в качестве химиотерапевтических противоопухолевых средств разрабатываются селективные ингибиторы и модификаторы метаболизма полиаминов [8; 44]. Кроме того, показано, что аналоги природных полиаминов могут мимикрировать под биогенные полиамины на молекулярном уровне, но

не способны заменять природные полиамины в процессах клеточной пролиферации, что также может быть использовано в биомедицинских целях [34]. Следовательно, воздействие лекарственных средств на метаболизм полиаминов может оказаться уникальным инструментом для управления патологическим процессом [10]. Обнаружена способность спермидина влиять на состояние иммунной системы. Показано, что он обладает иммуномодулирующим действием на линию NR8383 макрофагов, ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов, ФНО- α и моноцит-хемоаттрактантных белков-1 (MCP-1) [38]. Иммуномодулирующие свойства спермидина могут быть использованы при создании средств для лечения ряда болезней, таких как рак, различные инфекции, а также иммунодефицитные состояния. Исследовано влияние спермидина и его солей (уксусной, лимонной, глутаровой или винной в комбинации с носителями, стабилизаторами в виде сиропов, инъекций, таблеток, гранул, капсул, суппозиторий или мазей) при введении животным в количестве 0,005–50 мг/кг веса тела в день. Показано, что в дозе 0,005–5 мг/кг спермидин влияет на активность супрессорных клеток. Добавление спермидина к культуре клеток селезенки увеличивает продукцию ими интерлейкина-2, независимо от стимуляции Con A, оказывает ингибирующий эффект на рост опухолевых клеточных линий IMC и L-1210. Противоопухолевый эффект показан на IMC-карциноме, трансплантированной CDF₁ мышам. В дозе 0,05–50 мг/кг веса тела в день наблюдается ингибирование роста опухоли на 30–60 %. Спермидин в дозе 5 мг/кг у мышей с имплантированной лейкемией (клетки L-1210) после 10-кратного применения вызывает полную ремиссию у 30 % животных. В сочетании с противоопухолевым средством – блеомицином [35; 36] – наблюдается синергидный эффект (более длительное время жизни мышей, чем при использовании одного блеомицина или спермидина).

Известно, что большое значение в характеристике лекарственных препаратов имеет уровень токсичности. Показано, что среднесмертельная доза для спермидина при пероральном введении крысам составляет 600 мг/кг. Обнаружено, что амины, в том числе и спермидин, вызывают у крыс снижение артериального давления после внутривенного введения и вызывают падение температуры тела. Скармливание спермидина крысам в течение 6 недель приводило к уменьшению в плазме уровней креатинина, кальция и неорганического фосфора. При введении перорально дозы 1000 ppmol (83 мг/кг веса тела в день) неблагоприятные эффекты не наблюдаются [41]. Показано также, что спермидин нетоксичен в дозе 250 мг/кг при внутривенном введении мышам [35; 36].

Интерес к спермидину как потенциальному препарату подтверждается его регистрацией в Банке лекарств (DrugBank, США). Банк лекарств (США) является уникальным биоинформационным и химико-информационным ресурсом, который объединяет описание лекарственных средств (химические, фармакологические и фармацевтические) с их всеобъемлющими мишенями. База данных содержит около 5000 описаний, включая около 1550 одобренных FDA и 3 450 – экспериментальных лекарств. К числу последних относится спермидин (Spermidine). Спермидин зарегистрирован в DrugBank под номером DB03566, в статусе экспериментального объекта, в виде малой молекулы (Drug Type: Experimental, Small Molecule). Подчеркнуто, что спермидин найден почти во всех тканях в ассоциации с нуклеиновыми кислотами, он является катионом при всех рН и стабилизирует клеточные мембраны и нуклеиновые кислоты [42].

Представленные результаты исследований свидетельствуют, что спермидин обладает рядом уникальных биологических свойств, низким уровнем токсичности, подвержен разрушению эндогенными ферментативными системами, что ставит его в число перспективных объектов для использования при конструировании препаратов с улучшенными свойствами.

Создание биотерапевтических препаратов с использованием спермидина

Катионные полиамины, в том числе и спермидин, являются хорошими переносчиками биологически активных (терапевтических) молекул в клетки, что используется при создании новых препаратов.

С целью получения новых противоопухолевых препаратов для фотодинамической терапии синтезированы полиамин – порфириновые конъюгаты, несущие две (в *цис*- и *транс*- позициях) или четыре молекулы спермидина или спермина. Показано, что такие конъюгаты связываются с ДНК, и под действием облучения происходит фоторазрезание ДНК. Эти данные демонстрируют возможность использования конъюгатов полиамин – порфирин в качестве агентов для фотодинамической терапии [16]. Для улучшения фармацевтических свойств платины, широко используемой в онкологии, созданы и изучаются комплексы платины со спермидином. Показано, что присутствие спермидина повышает противоопухолевый эффект соединений платины [18; 32]. Это может свидетельствовать о возможности использования спермидина в качестве компонента противоопухолевых лекарств. Обращает на себя внимание тот факт, что спермидин не препятствует проявлению активности других компонентов изучаемых комплексных препаратов, что говорит о его пригодности для создания комплексных или многокомпонентных медицинских препаратов.

Возможность использования спермидина в составе средства доставки нуклеиновых кислот показана группой авторов под руководством V. Janout et S.L. Regen, которые разрабатывают «молекулярные зонтики» – амфотерные соединения. Эти соединения формируют гидрофобные или гидрофильные поверхности в зависимости от гидрофильного или гидрофобного микроокружения. Такие молекулы состоят из двух или более амфифилов, связанных с центром. «Молекулярные зонтики» синтезируют с использованием в качестве «стенок» зонтика желчные кислоты и полиамины, такие как спермин и спермидин и 1-лизина в качестве ветвей. Такие «зонтики» способны транспортировать вдоль липосомальных мембран пассивной диффузией гидрофильные пептиды, нуклеотиды и олигонуклеотиды. Они также могут увеличивать водную растворимость и гидролитическую стабильность гидрофобных лекарств и проявлять существенную противовирусную активность. Показано, что такие флуоресцентно меченые «молекулярные зонтики» проникают в клетки HeLa, что подтверждает возможность использования их в качестве носителей лекарств [23; 31]. H.L. Phama et al. синтезированы, очищены и исследованы физико-химические свойства катионного иммуностимулирующего комплекса, состоящего из полиаминов, присоединенных к остатку глюкуроновой кислоты сапонина QuilA. Полученные коллоидальные частицы имели размер 245–400 нм и положительный зета-потенциал. Подобные частицы могут быть использованы для доставки нуклеиновых кислот или анионных белков [39].

Интересными оказались результаты создания на основе конъюгата «спермидин-полиглокин» транспортного средства для дсРНК. Для этого получена молекулярная конструкция в виде вирусоподоб-

ной частицы (ВПЧ), содержащей в центре дсРНК и защищенной конъюгатом «спермидин-полиглокин» [5]. Размер такой наночастицы составляет 25–50 нм. При внутривенном введении она распределялась по периферическим органам и тканям и быстро элиминировалась из кровеносного русла мышей. Наиболее высокое содержание препарата было в почках, селезенке, кишечнике. Основным путем выведения ВПЧ-дсРНК являлись почки [2]. Уровень токсичности и регистрируемые эффекты (снижение массы тела, температуры, изменение гематологических, биохимических показателей и т.д.) ВПЧ-дсРНК не отличаются от эффектов свободной дсРНК. В ряде случаев негативные эффекты были более выраженными на введение дсРНК, чем ВПЧ-дсРНК. Это свидетельствует о том, что присутствие спермидина в составе ВПЧ-дсРНК не усиливает токсические эффекты и не блокирует биологические эффекты дсРНК [25; 30]. Для дсРНК в составе ВПЧ показана повышенная устойчивость к действию нуклеаз, по сравнению со свободной дсРНК. Достоинством данной конструкции является то, что ее составляющими являются модуляторы иммунного ответа (дсРНК, спермидин и полиглокин) и ее биodeградируемость, поскольку в организме имеются ферменты, разрушающие спермидин и дсРНК.

Данная молекулярная конструкция перспективна в качестве фармакологического препарата, в том числе и для транспорта белковых молекул. Эта идея была реализована при конструировании нанопрепарата «ВПЧ-дсРНК-рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа человека» (ВПЧ-дсРНК-ФНО- α) [3].

В результате исследования ВПЧ-дсРНК-ФНО- α на мышах – опухоленосителях было установлено повышение накопления ФНО- α в опухолевой ткани, снижение эффективной противоопухолевой дозы ФНО- α и повышение значений ЛД₅₀ по сравнению с ЛД₅₀ свободного ФНО- α .

Перспективным направлением биотерапии является генная терапия. Внимание исследователей концентрируется на создании невирусных систем доставки генов, которые являлись бы стабильными, безопасными и простыми. Все большее внимание в качестве средств доставки привлекают катионные полимерные системы, которые являются эффективными переносчиками генов [45]. Способность катионного полиамина спермидина хорошо связываться с нуклеиновыми кислотами используется в настоящее время при создании генсодержащих препаратов.

Так, с использованием спермидина был создан невирусный вектор с низкой токсичностью для переноса генов. Для этого был синтезирован ряд алкил-олигоаминовых производных низкотоксичного ПЭИ с ММ 10 kDa с помощью реакции ПЭИ с серией омега-бромоалкилкарбокисильных кислот с различной длиной цепи, и далее добавления различных полиаминов, в том числе спермидина. Модифицированный таким образом полиэтиленмин образовывал с плазмидной ДНК наночастицы размерами около 100 нм. Показана эффективность трансфекции с помощью такого вектора гена люциферазы в клетки мышинной нейробластомы N2A [12]. Создано соединение, состоящее из спермидина, ковалентно связанного с холестерином, названное авторами «Transfectall». При использовании генов люциферазы и бета-галактозидазы показано, что происходит высоковоспроизводимая и эффективная трансфекция генов в клетках NuH-7. Авторы считают, что комплекс спермидин-холестерин может осуществлять перенос других генов в клетки млекопитающих [33]. Подобные катионные амфилилы, облегчающие транспорт терапевтических молекул в клетки, описаны в патенте США [37].

Амфифилы содержат липофильные группы стероидов и катионные группы производных аминов, алкиламинов или полиалкиламинов. Показано, что спермидин-холестерокарбамат эффективно переносит ген, кодирующий трансмембранный регуляторный белок цистного фиброза человека (CFTR) в иммортализованные клетки цистного фиброза человека (CFT-1) и также эффективно переносит гены при интраназальном и внутривенном введении мышам. Предложенные соединения могут использоваться для переноса таких биологически активных молекул, как рибосомальная РНК, антисенполинуклеотиды, РНК или ДНК, рибозимы, полинуклеотиды геномной ДНК, кДНК, мРНК.

Получен новый катионный полимер полифосфорамидспермидин, обладающий способностью связывать плазмидную ДНК и обеспечивающий ее проникновение в клетку. Такой искусственный полимер оказался менее токсичным, чем полифосфорамид, и обеспечивал доставку терапевтического *bcl-2* в спинной мозг при введении в язык мышей [45].

Экспериментально доказана возможность использования конъюгата «спермидин-полиглокин» как средства адресной доставки генов. Взаимодействие последнего с плазмидой, содержащей ген рГ-КСФ, стимулятора гемопоэза, привело к созданию наночастицы, в центральной части которой находилась ДНК [40]. Наночастица имела сферическую форму и размер от 10 до 25 нм. Показана сохранность плазмидной ДНК в составе этой молекулярной конструкции в течение суток после обработки смесью ДНКазы и РНКазы, в то время как плазмидная ДНК в тех же условиях полностью разрушалась через 30 мин. Сохранность ДНК в молекулярной конструкции регистрировалась в плазме крови также в течение 24 ч. Накопление конструкции наблюдали в костном мозге мышей после введения препарата в дозе 100 мкг на животное. Через 7–8 сут. после введения молекулярной конструкции, содержащей ген рГ-КСФ, в сыворотке крови мышей выявили антитела к Г-КСФ человека. Это служит подтверждением того, что в клетках костного мозга, куда была доставлена конструкция, происходит экспрессия гена рГ-КСФ. Подобная конструкция была создана с геном интерлейкина-2 для введения ее в эукариотические клетки. Показана большая сохранность ДНК в составе ВПЧ-ДНК/ИЛ-2 по сравнению со свободной плазмидной ДНК [4]. Эти данные свидетельствуют о том, что использование конъюгата «спермидин-полиглокин» как транспортной системы для ДНК позволяет повысить устойчивость ДНК к ферментативным системам крови и обеспечить доставку в ткани-мишени. Показана возможность применения конъюгата «спермидин-полиглокин» для создания вакцин. С этой целью были сконструированы ВПЧ, содержащие в центральной части плазмидные ДНК, гены вирусных белков, а на поверхности – антигены инфекционного агента. На основе этих конструкций были получены экспериментальные образцы кандидатных вакцин против туберкулеза и клещевого энцефалита, показана их высокая эффективность при иммунизации лабораторных животных [1; 9; 17].

Литература

1. Азаев М.Ш., Лебедев Л.Р., Туманов Ю.В. и др. Получение искусственных микобактериальных частиц и исследование их иммуногенных свойств // Биотехнология. – 2004. – 4. – С. 34–40.
2. Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д., Батенева А.В. и др. Фармакокинетика молекулярной конструкции... // Сибирск. Мед. Ж. – 2008. – 23(3)(вып. 2). – С. 92–5.
3. Заявка на патент РФ №2008140246 от 13.10.08 г. Противоопухолевое средство на основе наночастицы, несущей рекомбинантный фактор... / Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д. и др.
4. Лебедев Л.Р., Бульчев Л.Е. и др. Изучение цитокинового профиля... // Иммунология. – 2007. – 28(3). – С. 143–7.

Полученные образцы кандидатных вакцин вызывают пролонгацию иммунного ответа, выступая в качестве своеобразного депо антигенов инфекционного агента, что, по-видимому, обусловлено повышенной устойчивостью белков, экспонированных на поверхности ВПЧ, к действию протеаз. Создание конструкции, содержащей в центральной части плазмиду с генами, кодирующими белки клещевого энцефалита, а на поверхности – эпитопы HIV-I, позволило индуцировать иммунный ответ как против ВИЧ, так и против вируса клещевого энцефалита.

Накоплены значительные сведения о конструировании и исследовании кандидатной полиэпитопной вакцины против ВИЧ – КомбиВИЧвак, в центре которой находится плазида рсDNA-TCI, кодирующая искусственный поли-CTL-эпитопный Т-клеточный иммуноген (TCI, T Cell Immunogen), содержащий более 80 Т-клеточных эпитопов, покрытая оболочкой из конъюгата «спермидин-полиглокин», а на поверхности экспонирован белок ТВ1, содержащий четыре Т-клеточных эпитопа и пять В-клеточных эпитопов из белков ВИЧ-1 Env и Gag [25–27]. Иммунизация мышей этой вакциной вызывала появление ВИЧ-1-специфических антител. Сыворотки мышей, иммунизированных КомбиВИЧвак, активно подавляют размножение вируса в разведении 1:100. Эффективность подавления размножения вируса этими сыворотками сравнима с аналогичной характеристической сыворотки человека, больного ВИЧ. В токсикологических экспериментах на мышах при введении кандидатной вакцины КомбиВИЧвак внутримышечно показано отсутствие выраженных отклонений в состоянии жизненно важных органов, иммунной системы, гематологических, морфологических показателей.

Заключение

Таким образом, спермидин является веществом, которое представлено в бактериях, вирусах, растениях, клетках млекопитающих, т.е. является эндогенно синтезируемым продуктом. Спермидин поступает в организм с продуктами питания. В организме млекопитающих существуют системы биodeградации спермидина, который разрушается и выводится из организма естественным способом. Спермидин связывает как дсРНК, так и с ДНК, связывание слабо зависит от состава оснований. Спермидин обладает иммуномодулирующим действием. С использованием спермидина создаются и исследуются комплексные соединения и средства для транспортировки биологически активных веществ в клетки и ткани. Сконструировано несколько типов кандидатных вакцин, которые обеспечивают формирование специфических иммунных ответов к возбудителям инфекционных заболеваний. Эндогенное происхождение, связывание с ДНК, дсРНК, РНК, олигонуклеотидами и другими малыми молекулами, биodeградируемость, биологическая (иммуотропная, противоопухолевая) активность, слабо выраженные токсические свойства спермидина позволяют рассматривать его как перспективное средство для создания иммунобиологических и терапевтических препаратов нового поколения.

5. Патент РФ 2190018. Молекулярный вектор для доставки генов в клетки-мишени / Сизов А.А., Лебедев Л.Р., Масычева В.И., Даниленко Е.Д.
6. Патент РФ 2317107. Рекомбинантная вакцина против вируса иммунодефицита человека 1 типа / Карпенко Л.И., Лебедев Л.Р., Бажан С.И. и др.
7. *Свинареп В.И.* Роль полиаминов в этиопатогенезе шизофрении. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2007. – 41 с.
8. *Amendola R., Cervelli M., Fratini E. et al.* Spermine metabolism and anticancer therapy // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2009. – Vol. 9(2). – P. 118–30.
9. *Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V. et al.* Designing and engineering of DNA- vaccine...//*Vaccine.* – 2004. – Vol. 22(13/14). – P. 1672–82.
10. *Casero R.A., Pegg A.E.* Polyamine catabolism and disease // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 421(3). – P. 323–38.
11. *Chattopadhyay M.K., Tabor C.W., Tabor H.* Polyamines are not required... // *J. Bacteriol.* – 2009. – Jun 19.
12. *Dehshahri A., Oskuee R.K., Shier W.T. et al.* Gene transfer efficiency of high primary amine content, hydrophobic, alkyl-oligoamine derivatives of polyethylenimine // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30(25). – P.4187–94.
13. *Demidenko A.A., Nibert M.L.* Probing the transcription mechanisms of reovirus cores with molecules that alter RNA duplex stability // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83(11). – P.5659–70.
14. *Deng H., Bloomfield V.A., Benevides J.M., Thomas G.J.* Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interaction with genomic B-DNA of different GC content probed by Raman spectroscopy // *Nucl. Acids. Research.* – 2000. – Vol. 28(17). – P. 3379–85.
15. *Di Luccia A., Picariello G., Iacomino G. et al.* The in vitro nuclear aggregates of polyamines // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276(8). – P. 2324–35.
16. *Garcia G., Sarraya V., Sol V., Le Morvan C. et al.* DNA photocleavage by porphyrin-polyamine conjugates // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 17(2). – P.767–76.
17. *Goncharova E.P., Rysnikov A.B., Bulychiev L.E. et al.* A study of systems for delivering antigens and plasmid DNA for intranasal immunization against tick-borne encephalitis virus // *Wien. Klin. Wochenschr.* – 2002. – Vol. 114(13/14). – P. 630–5.
18. *Hegmans A., Kasparkova J., Vrana O. et al.* Amide-based prodrugs of spermidine-bridged dinuclear Platinum. Synthesis, DNA binding, and biological activity // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51(7). – P. 2254–60.
19. *Higashi K., Terui Y., Suganami A. et al.* Selective structural change by spermidine in the bulged-out region of double-stranded RNA and its effect on RNA function // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283(47). – P.32989–94.
20. *Higashi K., Terui Y., Inomata E. et al.* Selective structural change of bulged-out region of double-stranded RNA...// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 370(4). – P. 572–7.
21. *Igarashi K., Kashiwagi K.* Modulation of cellular function by polyamines // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2009.
22. *Igarashi K., Sakamoto I., Goto N. et al.* Interaction between polyamines and nucleic acids or phospholipids // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1982. – Vol. 219. – P. 438–43.
23. *Janout V., Regen S.L.* Bioconjugate-based molecular umbrellas/Bioconjug. Chem. – 2009. – Vol. 20(2). – P. 183–92.
24. *Jin H.T., Raty S., Minkinen M. et al.* Changes in blood polyamine levels in human acute pancreatitis // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 14. – P. 1–8.
25. *Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M. et al.* Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine design, immunogenicity and toxicity studies // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25(21). – P. 4312–23.
26. *Karpenko L.I., Lebedev L.R., Ignatyev G.M. et al.* Construction of artificial virus-like particles exposing HIV epitopes, and the study of their immunogenic properties // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21(5–6). – P.386–92.
27. *Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Ilyichev A.A. et al.* Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated Salmonella strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen // *Vaccine.* – 2004. – Vol. 22(13/14). – P. 1692–9.
28. *Kuramochi H., Yonezawa Y.* Formation of large DNA...//*J. Biosci. Bioeng.* – 2001. – Vol. 92(2). – P. 183–5.
29. *Maruyoshi K., Nonaka K., Sagane T. et al.* Conformational change of spermidine upon interaction with adenosine triphosphate in aqueous solution // *Chemistry.* – 2009. – Vol. 15(7). – P. 1618–26.
30. *Masycheva V.I., Danilenko E.D., Gamaley S.G. et al.* A combined DNA protein HIV-1 vaccine containing polyepitope B-and T-cell immunogens: results of preclinical studies// *International symp. on HIV and emerging infectious diseases (15; 28-30 may 2008; Toulon, France)* : *Abstr. HIV clinical trials.* – 2008. – 9(Suppl.1). – P. 71. PD1/01.
31. *Mehiri M., Chen W.H., Janout V., Regen S.L.* Molecular umbrella transport: exceptions to the classic size/lipophilicity rule // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131(4). – P. 1338–9.
32. *Montero E.I., Benedetti B.T., Mangrum J.B. et al.* Pre-association of polynuclear platinum anticancer agents on a protein, human serum albumin. Implications for drug design // *Dalton Trans.* – 2007. – Vol. 43. – P. 4938–42.
33. *Moradpour D., Schauer J. I., Zuravski V. R. et al.* Efficient gene transfer into mammalian cells with cholesterol-spermidine // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 221(Iss.1). – P. 82–8.
34. *N'soukpoé-Kossi C.N., Ouameur A.A., Thomas T. et al.* DNA interaction with antitumor polyamine analogues: a comparison with biogenic polyamines // *Biomacromolecules.* – 2008. – Vol. 9(10). – P. 2712–8.
35. Patent EPO 0116693. An immunopotentiator having spermidine or its pharmacologically acceptable salt as active ingredient / Umesawa H., Takeuchi T., Ishizuka M.
36. Patent US 4559362. Immunopotentiator / Umesawa H., Takeuchi T., Ishizuka M.
37. Patent US 5783565. Cationic amphiphiles containing spermine or spermidine cationic group for intracellular delivery of therapeutic molecules / Lee E. R., Harris D.J., Siegel C.S. et al.
38. *Pérez-Cano F.J., Franch A., Castellote C., Castell M.* Immunomodulatory action of spermine and spermidine on NR8383 macrophage line in various culture conditions // *Cell. Immunol.* – 2003. – Vol. 226(2). – P. 86–94.
39. *Pham H.L., Ross B.P., McGeary R.P. et al.* Synthesis of cationic derivatives of Quil A and the preparation of cationic immune-stimulating complexes (ISCOMs) // *Int. J. Pharm.* – 2009. – Vol. 376(1-2). – P.123–33.
40. *Sizov A.A., Lebedev L.R., Masycheva V.I. et al.* The development of a virus-like construct for the in vivo receptor-mediated delivery of the human granulocyte colonostimulating factor gene to bone marrow cells // *Rus. J. Biotech.* 2001. – Vol. 1(1). – P. 8–11. (Translated from *Biotekhnologiya.* – 2001. – 1. – P. 13–18).
41. *Til H.P., Falke H.E., Prinsen M.K., Willems M.I.* Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats // *Food. Chem. Toxicol.* – 1997. – Vol. 35(3–4). – P. 337–48.
42. URL: <http://www.drugbank.ca/search/search?query=spermidine> (обращение 03.04.2009).
43. URL: <http://www.rusmedserver.ru/med/haris/291.html> (обращение 03.04.2009).
44. URL: www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0269-03-vol200.pdf – (обращение 12.04.2009).
45. *Wang J., Zhang P.-Ch., Lu H.-F. et al.* New polyphosphoramidate with a spermidine side chain as a gene carrier // *J. Contr. Release.* – 2002. – Vol. 83. – P. 157–68.

Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИФН- α -2b ЧЕЛОВЕКА С ПОЛИГИСТИДИНОВОЙ СИСТЕМОЙ И БЕЗ НЕЕ

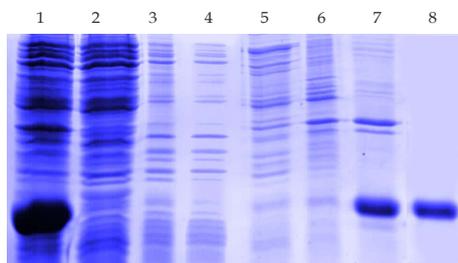
Лаборатория трансгенных препаратов РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Задача исследования. Сравнить уровень экспрессии и эффективность очистки рекомбинантного Интерферона- α -2b человека (чИФН- α -2b) с полигистидиновой системой и без нее, выбрать наиболее удачную по этим показателям конструкцию.

Материалы и методы. Для экспрессии использовали культуры *Escherichia coli*. Индукцию проводили при помощи IPTG. Очищение включало в себя три этапа. На первом этапе изолировали нерастворимые белки путем центрифугирования лизата бактериальных клеток. На втором – провели промежуточную отмывку телец включения чИФН- α -2b. Окончательное очищение осуществили при помощи аффинной хроматографии.

Результаты. Мы синтезировали три генетические конструкции чИФН- α -2b: без гистидинового конца, с одним и с двумя полигистидиновыми повторами (6His и 12His). В ходе работы выяснили, что наличие полигистидиновой системы увеличивает уровень экспрессии рекомбинантного чИФН- α -2b. При этом второй 6His несколько снижает ее.

чИФН- α -2b-6His полностью агрегируется в виде телец включения. Результаты работы показали, что промежуточная стадия очищения необходима для чИФН- α -2b-6His, т.к. увеличивает эффективность посадки белка на сорбент и качество отмывки белков бактериальной клетки. Эффективность отмывки телец включения составила 80%. В случае чИФН- α -2b и чИФН- α -2b-12His необходимо изменение состава промывочных буферов, т.к. часть целевого белка уходит в смывы. При проведении аффинной хроматографии выяснили, что чИФН- α -2b-6His полностью связывается с сорбентом. Конечный продукт очищен более чем на 90% (см. рисунок).



1. Лизат клеток BL21(DE3), экспрессирующих чИФН- α -2b-6His.
2. Супернатант после центрифугирования лизата.
3. Отмывка телец включения PBS.
4. Отмывка телец включения буфером 1.
5. Отмывка телец включения буфером 2.
6. Отмывка телец включения буфером 3.
7. Отмытые тельца включения.
8. чИФН- α -2b-6His после очистки на колонке.

Выводы. Полученные результаты позволяют утверждать, что в отношении уровня экспрессии и эффективности очистки наиболее удачна конструкция с одним 6His на N-конце.

А.Ф. Лазарев, В.Д. Петрова, Н.А. Михеева, Е.Л. Секержинская, Т.В. Синкина

ОЦЕНКА ПЕРЕНОСИМОСТИ ПРЕПАРАТА АНАСТЕРЫ У ПАЦИЕНТОК С ПРОГРЕССИРУЮЩИМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,

ГУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», Барнаул

Актуальность. Лечение метастатического рака молочной железы может включать в себя хирургическое вмешательство и лучевую терапию. Но на сегодняшний день, установлено, что главным в программе специального лечения таких пациенток является системное воздействие – проведение химио- и эндокринотерапии. Для больных с гормональным рецептор-положительным раком молочной железы эндокринное лечение представляет терапевтический выбор, который обладает лучшими профилями безопасности, нежели цитотоксическая химиотерапия. Как правило, при генерализации процесса имеет место резистентность к тамоксифену, и женщинам назначают препараты третьего поколения – ингибиторы ароматазы: анастрозол, летрозол и экземестан. В 2006 году в России зарегистрирован препарат Анастера, который также является ингибитором ароматазы. Однако широкого опыта применения данного препарата нет.

Задачей данного пилотного исследования явилась оценка переносимости и побочных действий препарата Анастера.

Материал и методы. В данном исследовании были оценены переносимость и побочные действия у 28 пациенток (ср. возраст 58,7 лет; менопауза > 5 лет) с генерализованным раком молочной железы, имевших положительный гормонорецепторный статус. В анамнезе у всех – комбинированное и комплексное лечение по поводу рака молочной железы и адъювантная антиэстрогенная эндокринотерапия тамоксифеном. Функциональный статус 0-2 балла по шкале ECOG. Препарат Анастера назначали один раз в день по 1 таблетке (1 мг) в течение 3 мес. Сведения о побочных действиях и переносимости анализировали с помощью анкетирования один раз месяц. Оценивали следующие побочные эффекты: наличие тошноты и рвоты, слабости, анорексии или повышенного аппетита, головных болей, приливов, бессонницы, запоров или диареи, сыпи, периферических отеков, повышенного давления, набора веса, вагинальных кровотечений, потливости, артралгий.

В качестве группы сравнения были выбраны 29 пациенток, сопоставимых по всем характеристикам с исследуемой группой, получавших в течение 3 мес. препарат Аримидекс.

Результаты. Наиболее часто женщины, получавшие препарат Анастера, предъявляли жалобы на приливы и потливость – 9, причем, у 5 из них, данные симптомы были слабо выражены, у 3 – умеренно и у 1 – сильно. Головную боль отмечали 8 пациенток, у 3 из них головная боль была выражена слабо, у 5 умеренно. Жалобы на слабость, связанную с приемом препарата, отмечали 7 больных (у 3 – выражена слабо, у 4 – умеренно). Остальные побочные действия регистрировались в единичных случаях. Ни у одной из женщин препарат Анастера не был отменен в связи с плохой переносимостью. При сравнении с группой женщин, получавших препарат Аримидекс, достоверных отличий регистрации побочных действий выявлено не было.

Заключение. Препарат Анастера отличается хорошей переносимостью. Побочные действия находятся в диапазоне от слабых до умеренных и не требуют корректировки дозы.

112 Наша реклама + СвитчЧаилд

Содержание Российского Биотерапевтического Журнала за 2009

№ 1-2009

Материалы научной конференции с международным участием «НАНООНКОЛОГИЯ» Москва, 18 - 19 февраля

Направленная доставка противоопухолевых препаратов	4
Нанотехнологии в диагностике опухолей	13
Нанотехнологии в терапии опухолей	19
Правила оформления работ для опубликования в «Российском биотерапевтическом журнале»	26

БИОТЕРАПИЯ:

<i>В.С. Половинкина, В.С. Косоруков</i> РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЧГМ-КСФ В ОНКОЛОГИИ	29
---	----

НАНООНКОЛОГИЯ:

<i>Е.В. Тазина, В.В. Мецерикина, Е.В. Игнатьева, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, А.А. Вайнсон, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников</i> БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДОКСОРУБИЦИНА	40
---	----

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ:

<i>О.В. Калинина, СИ. Красиков, А.М. Шехтман, А.А. Штиль, Б.А. Фролов</i> ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИЛИАЦИНА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ МЕТОТРЕКСАТОМ	48
--	----

<i>Л.З. Болиева, А.В. Сергеев, М.Я. Шапкина</i> ВЛИЯНИЕ КАСКАТОЛА И СЕЛЕНА НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ ПЕЧЕНИ И ПИЩЕВОДА, ИНДУЦИРОВАННЫЙ У КРЫС N-НИТРОЗОДИЭТИЛАМИНОМ	55
---	----

<i>В.П. Дерягина, В.М. Любчанская, Н.И. Рыжова, В.И. Левина, Н.Б. Григорьев, В.Г. Граник</i> ДИНАМИКА РОСТА КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ F1 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДОНОРОВ NO – ПРОИЗВОДНЫХ 3-НИТРОБЕНЗОФУРАНА И 3-НИТРОИНДОЛА	60
---	----

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ:

<i>М.Е. Абрамов, С.Л. Гуторов, Е.Г. Славина, З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова, Е.В. Черноглазова, Л.Е. Ротобельская, М.Р. Личиницер</i> ХИМИОТЕРАПИЯ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ИНГАРОНА (Г-ИНФ). КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	64
---	----

<i>И.Н. Когарко, А.Ю. Барышников, С.Б. Когарко, А.К. Голенков, Б.С. Когарко, С. Мацеев</i> ГАММАПАТИИ: ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ИММУНОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ (ЧАСТЬ I)	75
---	----

<i>А.Х. Сабиров, В.Г. Бычков</i> НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ПРЕВЕНТИВНОЙ ОНКОЛОГИИ В ГИПЕРЭНДЕМИЧНОМ ОЧАГЕ ОПИСТОРХОЗА	81
<i>Т.В. Синкина, В.Д. Петрова, А.Ф. Лазарев</i> СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФАКТОРАХ РИСКА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	88
<i>А.Х. Сабиров, Н.М. Федоров, А.А. Шайн, А.А. Важенина, В.Г. Бычков</i> ПОДХОДЫ К ПРЕВЕНТИВНОЙ МАММОЛОГИИ	95

№ 2-2009

Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты»

ТЕЗИСЫ:

Экспериментальная онкология.....	3
Фотодинамическая терапия.....	26
Лекарственные формы.....	48
Растительные препараты.....	52
Клиническая онкология.....	57
Разное.....	64

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ:

<i>Г.Н. Апрышко</i> ТЕХНОЛОГИЯ РЕГИСТРАЦИИ НОВЫХ ВЕЩЕСТВ В БАНКЕ ДАННЫХ ПО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ВЕЩЕСТВАМ НИИ ЭДИТО ОНКОЛОГИЧЕСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН С ПОМОЩЬЮ «ЭЛЕКТРОННОГО ПАСПОРТА»	67
<i>Н.И. Переводчикова*, А.А. Феденко</i> ОСОБЕННОСТИ МЕТОДИКИ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ	75
<i>Лесная Н.А., Покровский В.С., Романенко В.И, Трещадина Е.М.</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПЕРЕНОСИМОСТЬ ТРОЙНОЙ КОМБИНАЦИИ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ЭТОПОЗИДА, ЦИСПЛАТИНА И АРАНОЗЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС У МЫШЕЙ	79
<i>Е.Л. Секержинская, А.Ф. Лазарев, В.Д. Петрова</i> ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ	85

БИОТЕРАПИЯ:

Воробьев С.И.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕИОНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ – СТАБИЛИЗАТОРОВ МУЛЬСИЙ.....3

Макарова М.В., Доннер Н.Е., Флейшман Д.И., Морозова О.В., Лазаревич Н.Л.

ЧАСТИЧНАЯ РЕВЕРСИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ИНАКТИВАЦИЕЙ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА $\beta 2$9

Мосиенко В.С., Шляховенко В.А., Яниш Ю.В., Козак В.В., Карнаушенко Е.В., Вербиненко А.В., Милиневская В.А., Мазур О.В.

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОПЕПТИДНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ НА РОСТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЕТАСТАЗИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ.....15

Хромова Н.В., Копнин П.Б., Степанова Е.В., Копнин Б.П.

ВЛИЯНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ СИНТЕЗА VEGF-C В КЛЕТКАХ РАКА ЛЕГКОГО И ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА НА ИХ РОСТ, МИГРАЦИОННУЮ И АНГИОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ.....21

Чмутин Е.Ф., Иванов П.К., Гриневич А.С.

РАЗРАБОТКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОНКОЛОГИИ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ.....27

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ:

Ваня Боят, Оганесян Е.А., Балабаньян В.Ю., Алятудин Р.Н.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ПАКЛИТАКСЕЛА.....37

Кладиев А.А., Степанова Е.В., Соломко Э.Ш., Кельцев В.А., Немцов Б.Ф., Барышников А.Ю.

АНТИАНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОСПИДИНА *IN VITRO*.....45

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ:

Калишьян М.С., Седякова Л.А., Райхлин Н.Т., Трещалина Е.М., Лукашева Е.В.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПО СХЕМЕ АС В СОЧЕТАНИИ С БИНАРНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ ТЕРАФТАЛ+АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА НА МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШЕЙ.....51

Лазарев А.Ф., Россаха А.В., Мамаев А.Н., Ходоренко С.А., Мамаева И.В., Назаров А.В., Цывкина Л.П., Баркаган З.С.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА VPA ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ТРАНСФУЗИОННОЙ НАГРУЗКИ ВО ВРЕМЯ ОПЕРАЦИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ.....57

Покровский В.С., Трещалина Е.М., Бычков М.Б.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ДИССЕМИНИРОВАННОГО МЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО.....61

Лесная Н.А., Покровский В.С., Романенко В.И., Трещалина Е.М.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПЕРЕНОСИМОСТЬ КОМБИНАЦИЙ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ЭТОПОЗИДА, ЦИСПЛАТИНА И АРАНОЗЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС У МЫШЕЙ.....69

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ:

Беришвили А.И., Лактионов К.П.

**ПЕРВИЧНАЯ И ВТОРИЧНАЯ
ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНАЯ ФОРМЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ:
СХОДСТВО ИЛИ РАЗЛИЧИЯ?**.....75

Иниаков А.Н., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю., Трифонова Е.В., Катаева Е.В., Голенков А.К.

**ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ САРКОЛИЗИНА *IN VITRO*
И ЕГО КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ
МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ**.....81

Шаповалов Д.А., Комаров И.Г., Кузнецов В.В., Слетина С.Ю.

**ВИДЕОХИРУРГИЯ КАК МЕТОД РАДИКАЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ
И ПОЛНОЦЕННОГО СТАДИРОВАНИЯ РАКА ТЕЛА МАТКИ**.....85

Солодянкина Т.Н., Апанасевич В.И.

ОШИБКИ В ДИАГНОСТИКЕ I СТАДИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ.....93

Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К., Дигаева М.А., Воротников И.К., Давыдов М.И.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕЙ В КЛИНИКЕ –
ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ**.....95

Зейналова К.Р., Вишневская Я.В., Ганьшина И.П.

**ТРАСТУЗУМАБ В КОМБИНАЦИИ С ДОЦЕТАКСЕЛОМ
И КАРБОПЛАТИНОМ В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ТЕРАПИИ
МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННОГО РМЖ
С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ HER-2
(КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**.....103

ОБЗОРЫ:

Дейчман А.М., Зиновьев С.В., Барышников А.Ю.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И МАЛЫЕ РНК В ОНКОЛОГИИ.....107
К 75-ЛЕТИЮ ОЛЕГА НИКОЛАЕВИЧА ЧУПАХИНА

**МАТЕРИАЛЫ VIII ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ».**

ТЕЗИСЫ.....19, 8, 20, 26, 56, 80

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

С уважением,
главный редактор А.Ю. Барышников

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БКС – бинарная каталитическая система
ВЧД – внутричерепное давление
в/б – внутрибрюшинно
в/в – внутривенно
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома
 бГК – быстрорастущая дедифференцированная гепатоцеллюлярная карцинома
 мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная карцинома
ГПВ/GPV – гликопептидная противоопухолевая вакцина /glycopeptide cancer vaccine
ДМБА – диметил- α -бензантрацена
ЗНО – злокачественные новообразования
ЛТ – лучевая терапия
МЛ – моноклеарные лейкоциты
ММ – метамеллоцит(ы)
МКА – моноклональные антитела
ММ – множественная миелома
МРЛ – мелкоклеточный рак легкого
МРТ – магнитно-резонансная томография
НК – натуральные киллеры
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества
НПТ – наилучшая поддерживающая терапия
НХЛ – неходжкинская лимфома
ОбО – объективный ответ
ОО – отсутствие ответа
ОЦК – объем циркулирующей крови
РМЖ – рак молочной железы
 МР РМЖ – местнораспространенный рак молочной железы
 ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма рака молочной железы
РЭС – ретикулоэндотелиальная система
ПВП – поливинилпирролидон
ПД – пролиферация и дифференцировка
ПЗ – прогрессирование заболевания
ПО – полный ответ
ПОПР – полиоксипропилен
ПФОС – перфторорганические соединения
ПХТ – полихимиотерапия
ПЯ – палочкоядерный
КРР – колоректальный рак
РКТ – рентгеновская компьютерная томография
РЛ – рак легкого
РМЖ – рак молочной железы
РПЖ – рак поджелудочной железы
РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов
РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками
СЗП – свежемороженая плазма
СПЖ – средняя продолжительность жизни
СЯ – сегментоядерный
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография
ФД – флуоресцентная диагностика
ФС – фотосенс
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ФТС – фетальная телячья сыворотка
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз
ХТ – химиотерапия
ЦФ – циклофосфан
ЧО – частичный ответ
ЭФР – эпидермальный фактор роста
EPR effect – enhanced permeability and retention effect (эффект повышения проницаемости и удерживания)
LLC – lung carcinoma Lewis (Mw – molecular weight (молекулярный вес)
HER – human epidermal growth factor receptor
TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor