

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№1 Том 11 2012 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук (отв. секретарь), 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. Тюлядин, д-р мед. наук, проф. (Москва), Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.Ж. Шубина, канд. биол. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

Редакционный совет

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

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

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

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

E-mail: biotherapy_rbi@mail.ru

Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 6,25 усл.-печ. листов,

подписано в печать 18.01.2012

Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел. +7 (499) 324 24 70; ronc@list.ru

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

Принт-менеджмент:

Типография «Огни Москвы»

Тел.: +7 (495) 933-87-78

info@ognimsk.ru, www.ognimsk.ru

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Е.И. Михеевич, Н.П. Яворская, И.С. Голубева, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, С.А. Партолина, Н.А. Оборотова</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЦИФЕТРЕЛИНА ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ	3
<i>Л.И. Корытова, Г.Л. Васильев, В.Ф. Мус, Е.В. Немкова, Н.Д. Олтаржевская, М.А. Коровина</i> ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОСТРЫХ ЛУЧЕВЫХ ЭЗОФАГИТОВ ПРИ ХИМИОЛУЧЕВОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО	9
<i>Т.В. Михайлова, М.А. Барышников, Н.С. Багирова, Н.В. Дмитриева, В.Р. Дуфлот, А.Ю. Барышников</i> СТЕРИЛИЗАЦИЯ МНОГОСЛОЙНЫХ ПРОТЕОЛИПОСОМ	13
<i>Н.В. Андреева, М.В. Волконский, М.С. Калашник, Е.М. Трещалина</i> МЕТОДИКА ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОЙ ИНФУЗИИ КРЫСАМ С ВНУТРИМЫШЕЧНО ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ОПУХОЛЮ	19
<i>Н.Ю. Анисимова, Ю.И. Должикова, В.А. Даванков, А.В. Пастухов, С.И. Милева, Ф.С. Сенатов, М.В. Киселевский</i> ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ НАНОСОСОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ СВЕРХСШИТЫХ ПОЛИМЕРОВ СТИРОЛА СЕРИИ СТИРОСОРБ	23
<i>Д.В. Филоненко, Н.В. Андреева, Е.М. Трещалина, Г.К. Герасимова</i> ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ БИНАРНЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФТАЛОЦИАНИНОВ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ВНУТРИПЛЕВРАЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПЛЕВРИТОВ	29
<i>А.Н. Хлебникова, Е.В. Селезнева, Л.Е. Гуревич, М.А. Бобров, Г.Э. Баграмова</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЕРАТИНОЦИТОВ И РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ДЕРМАЛЬНОГО ЭЛАЗТОЗА ПРИ АКТИНИЧЕСКОМ КЕРАТОЗЕ	35
<i>А.В. Таллерова, Л.П. Коваленко, А.Д. Дурнев, С.Б. Середенко</i> ВЛИЯНИЕ ЛАДАСТЕНА НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ Т-ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ТРЕВОЖНОЙ ДЕПРЕССИИ	39
<i>А.А. Шимширт, Т.С. Калинина, Т.А. Воронина</i> ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИАЗЕПАМА НА ТРЕВОЖНЫЕ РЕАКЦИИ У МЫШЕЙ, ВЫЗВАННЫЕ ИНДОМЕТАЦИНОМ	45
<i>И.В. Манина, А.М. Рыжик, Л.И. Стась, Е.Н. Долгина, И.Е. Сластушенская, В.Р. Тринько, П.Ф. Азизов, А.Ю. Сергеев, А.В. Караулов</i> ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С IgE-ЗАВИСИМЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ НА ФОНЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ	47
<i>В.В. Плетнев, Б.В. Пинегин, Т.Б. Мастерняк, С.И. Елкина, М.Ф. Никонова, Т.Ю. Харченко</i> ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКАРТЕНА	53
<i>М.А. Замкова, П.Б. Копнин, Н.В. Хромова, Б.П. Копнин</i> ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ HSF1 НА РОСТ КЛЕТОК РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO И IN VIVO	59
<i>Бершивили А.И., Лактионов К.П., Левкина Н.В., Кочоян Т.М., Керимов Р.А., Поликарпова С.Б.</i> КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С БЕЗРЕЦИДИВНОЙ И ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ БОЛЬНЫХ ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМОЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	65
<i>Т.П. Казубская, Д.С. Ходырев, И.В. Пронина, В.Д. Ермилова, Ю.Г. Паяниди, Н.В. Чхиквадзе, В.Ю. Сельчук, Э.А. Брага, В.И. Логинов</i> МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ, ВКЛЮЧАЯ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫЕ	69
<i>Алексеева И.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В., Волков А.В., Шураев А.И.</i> ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ОБЪЕМА КОСТНОЙ ТКАНИ НА ВЕРХНЕЙ ЧЕЛЮСТИ (СРОК НАБЛЮДЕНИЯ ДО 21 МЕСЯЦА)	75
<i>О.И. Костылева, А.В. Масляев, Ю.В. Крюк, А.А. Тулеуова, У.Р. Мамедов, О.М. Кузнецова, И.В. Терешкина</i> РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА	79

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Н.Г. Кормиш</i> ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ И ОРГАНИЗМА В ЦЕЛОМ – ВЗГЛЯД КЛИНИЦИСТА. Ч. 2	85
Правила оформления статей	8; 18; 22
От редакции	28
Список сокращений	91

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 615.2/3.012

*Е.И. Михеевич^{1,2}, Н.П. Яворская¹, И.С. Голубева¹, О.Л. Орлова¹,
А.П. Полозкова¹, С.А. Партолина¹, Н.А. Оборотова¹*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ
СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЦИФЕТРЕЛИНА
ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация:

Михеевич Екатерина Игоревна, аспирант;

адрес: 125315, Москва, ул. Усиевича, 23, 261; тел. +7 (499)612-88-34, моб. +7(910)412-04-23

e-mail: meldo@mail.ru

Статья поступила: 13.10.2011; подписана в печать: 18.01.2012

Резюме

В лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН синтезирован новый аналог соматостатина, цифетрелин, обладающий противоопухолевой активностью на разных моделях опухолей *in vivo*, в том числе – при пероральном введении. В связи с этим представляется актуальным исследование возможности создания лекарственной формы цифетрелина для перорального применения.

В настоящем исследовании предложен состав таблетированной лекарственной формы цифетрелина, позволяющий получить таблетки, удовлетворяющие всем требованиям ГФ XI. Установлено, что цифетрелин в таблетках не уступает по противоопухолевой активности субстанции цифетрелина при пероральном введении. По результатам работы сделан вывод, что предложенные для создания лекарственной формы вспомогательные вещества не мешают высвобождению цифетрелина из таблеток и не снижают его противоопухолевую активность.

Ключевые слова: соматостатин, аналоги соматостатина, пероральное введение пептидов, цифетрелин.

*E.I. Mikhaevich^{1,2}, N.P. Yavorskaya¹, I.S. Golubeva¹, A.P. Polozkova¹,
S.A. Partolina¹, N.A. Oborotova¹*

**STUDYING THE POSSIBILITY
OF ORAL DELIVERY
OF CIFETRELIN**

¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Abstract

In the Institute of experimental diagnostics and chemotherapy of FSBI «N.N. Blokhin CRC» RAMS a novel somatostatin analogue – cimetrelin – was synthesized. Cimetrelin has demonstrated antitumor activity on different experimental tumor models *in vivo*, including when orally administered. Taking this into account it seems to be worthwhile to investigate the possibility of development of cimetrelin drug formulation for oral delivery.

We have offered a composition for cimetrelin drug formulation, that allows to obtain tablets that meet all State Pharmacopoeia XI requirements. It was determined that antitumor activity of cimetrelin in tablets is comparable with antitumor activity of cimetrelin substance when orally administered. It may be concluded that offered for cimetrelin oral drug formulation excipients do not reduce the cimetrelin release and antitumor activity.

Key words: somatostatin, somatostatin analogues, peptide oral delivery, cimetrelin.

Введение

В настоящее время пептиды и белки стали препаратами выбора для лечения многих заболеваний вследствие своей непревзойденной селективности и способности оказывать мощное воздействие на мишени [6]. В целом препараты пептидной и белковой природы имеют меньше побочных эффектов и способны излечивать причину заболевания, а не просто купировать его симптомы. Сегодня благодаря достижениям биотехнологии на коммерческой основе производится множество различных пептидных и белковых препаратов [6; 9; 11]. К лекарственным препаратам белково-пептидной природы относятся препараты

гормонов (Инсулин, Тетракозактид, Окситоцин, Соматропин, Бусерелин, Октреотид и др.), иммуномодуляторы (интерферон бета-1а, интерлейкин-2 человеческий рекомбинантный), противоопухолевые средства (Ритуксимаб, Трастузумаб), стимуляторы гемопоэза (Молграмостим), ноотропы (Семакс), регенерирующие препараты (Актовегин) и многие другие [3]. Разработка систем доставки пептидов и белков представляет собой значительную трудность вследствие их физико-химических свойств, к которым относятся большой размер молекул, неустойчивость к действию ферментов, короткое время полужизни в плазме крови, иммуногенность и склонность к агрегации, адсорбции и денатурации [8].

Вследствие этого до сегодняшнего дня наиболее распространенными для соединений белково-пептидной природы являются лекарственные формы для парентерального введения. Большинство пептидных лекарственных препаратов благодаря хорошей растворимости в воде выпускаются в виде водных растворов (Сандостатин, Инсулин, Ганиреликс, Тимодепрессин, Церебролизин) для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения. Соединения, растворимые в воде, но нестойкие в водных растворах, выпускают в виде лиофилизатов [3] для приготовления растворов *ex tempore* (Бусерелин, Цетрореликс, Молграмостим).

С различным успехом были опробованы следующие пути введения пептидных препаратов: пероральный, трансбуккальный, интраназальный, трансдермальный и ректальный. Из указанных пероральный путь введения остается наиболее удобным для пациента и врача. Лекарственные формы для перорального введения имеют ряд преимуществ: безболезненность, отсутствие дискомфорта, отсутствие риска инфекционных поражений. Кроме того, производство пероральных лекарственных форм менее затратно, поскольку не требует стерильных условий. Помимо этого, накопленные данные позволяют говорить о том, что для некоторых полипептидов, таких как инсулин, пероральный путь введения является более физиологичным [7]. Однако вследствие упомянутых свойств пептидов и белков создание лекарственной формы для перорального применения весьма затруднительно. В виде таблеток выпускаются такие лекарственные препараты как Актовегин и Десмопрессин [3].

Одной из групп лекарственных препаратов белково-пептидной природы являются аналоги соматостатина (Сандостатин, Соматулин). Доказана эффективность аналогов соматостатина при симптоматической терапии секретирующих эндокринных опухолей желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы (карциноиды, ВИПомы, глюкагономы, гастриномы, инсулиномы) и нейроэндокринных опухолей [2; 12]. В последние годы начато изучение возможности применения этой группы препаратов для лечения других видов опухолей [5; 10]. Однако и в данном случае пока не удалось решить проблему создания лекарственных форм для перорального применения.

В лаборатории химического синтеза НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН был синтезирован новый аналог соматостатина – цифетрелин. Цифетрелин в отличие от других аналогов соматостатина не является циклическим пептидом. Все реакционно способные боковые группы в его молекуле защищены третбутилоксикарбонильной, бензилоксикарбонильной и тетрагидропиральной группами, благодаря чему цифетрелин частично сохраняется в кислой среде желудка [4], что позволяет рассматривать возможность создания лекарственной формы для перорального применения.

Цели настоящей работы:

- разработка модели лекарственной формы цифетрелина для перорального применения;
- оценка качества ЛФ в соответствии с требованиями ГФ XI;
- оценка эффективности *in vivo* в сравнении с субстанцией цифетрелина.

Материалы и методы

Цифетрелин синтезирован в необходимом для проведения химико-фармацевтических, технологических и биологических исследований количестве в ла-

боратории химического синтеза НИИ ЭДнТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН под руководством Смирновой Л.И. Субстанция цифетрелина была охарактеризована в соответствии с проектом ФСЦ, в используемой серии субстанции цифетрелина количественное содержание цифетрелина составляло не менее 96,8 %.

Таблетки цифетрелина получали с применением влажного гранулирования. В качестве гранулирующей жидкости использовали 5 %-ный крахмальный клейстер, поскольку цифетрелин нерастворим в воде. Смесь субстанции цифетрелина и вспомогательных веществ (лактоза, крахмал, целлюлоза микрокристаллическая, аэросил, ПВП в разных соотношениях) увлажняли в ступке гранулирующей жидкостью до получения тестообразной массы, которую протирали через сито с диаметром пор 1,5 мм. Гранулы высушивали на воздухе в течение 24 ч, снова протирали через сито с диаметром пор 1,5 мм, а затем опудривали смесью из 30 %-ного талька, 10 %-ного стеарата магния и 60 %-ного крахмала. Масса опудривающей смеси составляла 10 % от массы таблетки. Тщательно перемешивали и таблетировали на лабораторном таблеточном прессе фирмы «Egweka» (Германия). Масса таблетки составляла около 0,1 г.

Оценку качества полученных таблеток проводили в соответствии с требованиями ГФ XI [1].

1. При оценке внешнего вида таблеток обращали внимание на следующие параметры: края таблетки (ровные, со сколами), наличие/отсутствие расслаивания, качество поверхности (наличие мраморности, глянцевая или матовая поверхность).
2. Среднюю массу таблеток и массу отдельных таблеток определяли по стандартной методике, приведенной в ГФ XI [1].
3. Оценка прочности таблеток на истирание проводили на фриабиляторе типа TAR10 фирмы «Egweka» (Германия) по стандартной методике, приведенной в ГФ XI [1].
4. Тест на радиальное сжатие проводили на приборе ТВТ, фирмы «Egweka» (Германия). Таблетку помещали в специальную вставку на наковальне, регулируемой по высоте, и подводили к конусовидному поршню, оказывающему давление на таблетку до ее разрушения. По шкале прибора фиксировали величину давления, вызвавшего разрушение таблетки.
5. Оценку распадаемости таблеток проводили с помощью прибора «качающаяся корзинка» серии ZT300, фирмы «Egweka» (Германия) по стандартной методике ГФ XI [1].
6. Тест растворения для таблеток цифетрелина проводили по стандартной методике, описанной в ГФ XI [1], количество цифетрелина, перешедшего в раствор определяли методом спектрофотометрии.
7. Определение подлинности и количественное определение цифетрелина в таблетках также проводили с помощью спектрофотометрии (методики разработаны в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН).

Во всех трех тестах в качестве растворителя использовали 95 %-ный этиловый спирт. Раствор рабочего стандартного образца (РСО) готовили путем растворения точной навески субстанции цифетрелина в растворителе.

В качестве раствора сравнения использовали раствор вспомогательных веществ, входящих в состав таблеток, в 95 %-ном этиловом спирте.

Оптическую плотность раствора таблеток цифетрелина и РСО измеряли в диапазоне λ от 350 нм до 220 нм в кювете толщиной 10 мм относительно раствора сравнения. Электронный спектр поглощения цифетрелина имеет выраженный максимум поглощения при λ 282 нм. Качественное и количественное определение цифетрелина проводили по данному максимуму поглощения.

Животные были получены из питомника ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, содержались в одинаковых условиях вивария с брикетированным режимом кормления. В опытах использованы мыши-самки массой 18–21 г в возрасте 1,5–2 мес. Количество животных в контрольных группах составляло 10 мышей, в опытных – 7–8. Контролем являлись нелеченные животные.

Работа проведена на экспериментальной перевиваемой солидной опухоли РШМ-5. Штамм опухолевых клеток был получен в Банке криоконсервированных биоматериалов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Опухоль перевивали половозрелым мышам-самкам линии СВА2, инокуляцию проводили подкожно в правую подмышечную область мыши, каждой по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1 : 10 (5×5106 клеток).

Критерием эффективности цифетрелина являлось ТРО, которое вычисляли по формуле:

$$TPO, \% = \frac{V_k - V_0}{V_k} \times 100, \text{ где}$$

V_k и V_0 – средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытной группах соответственно. Объем опухоли определяли как произведение трех перпендикулярных измерений опухолевого узла.

Введение препарата животным начинали через 48 ч после перевивки опухолей. Субстанцию и таблетки цифетрелина вводили перорально с помощью зонда в 1 %-ном крахмальном клейстере в различных режимах. Измерения объема опухолей проводили на 7; 11; 14; 18; 22 и 25 дни после перевивки опухоли. Эффективными считали дозы препарата, вызывающие ТРО 50 % и более.

О токсичности препарата судили по числу павших животных до начала гибели животных в контрольной группе, макроскопической картине внутренних органов при вскрытии, а также по снижению массы тела более 20 %.

Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Фишера–Стьюдента. Различия сравниваемых величин считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для обеспечения возможности индивидуального подбора режима дозирования в зависимости от чувствительности опухоли и восприимчивости пациента к действию препарата в таблетки цифетрелина была заложена доза 6 мг.

Разработка состава модели таблеток цифетрелина и оценка их качества

Свойства субстанции цифетрелина исключают возможность прямого прессования, поэтому нами выбран метод таблетирования с предшествующим влажным гранулированием.

Поскольку цифетрелин нерастворим в воде, в качестве гранулирующей жидкости предложена

вода, а в качестве гранулирующего агента – картофельный крахмал. Для гранулирования использовали 5 %-ный крахмальный клейстер.

В качестве наполнителей (вспомогательных веществ) использовали лактозу (хорошо смешивается с субстанцией цифетрелина и обеспечивает необходимый объем таблетки), крахмал и целлюлозу микрокристаллическую.

Кроме того, крахмал обладает свойствами разрыхлителя (в водной среде набухает, обеспечивая дезинтеграцию таблетки), а целлюлоза микрокристаллическая увеличивает механическую прочность таблетки и улучшает сыпучесть гранулята.

В некоторые составы в качестве связывающего агента введен ПВП, а также аэросил, выполняющий функции разрыхлителя. Для исключения залипаемости на прессующий инструмент в состав таблеток введена опудривающая смесь, состоящая из талька, магния стеарата и крахмала в соотношении 3 : 1 : 6. В табл. 1 представлены результаты предварительной оценки качества модельных смесей для таблетирования цифетрелина.

По результатам оценки таблеток, полученных из пяти модельных смесей, отобран состав № 4 как обладающий оптимальными технологическими характеристиками. В соответствии с выбранным составом была проведена наработка таблеток цифетрелина для дальнейшего изучения.

Основные критерии качества таблеток цифетрелина были выбраны на основании требований ГФ XI [1]. Результаты оценки качества модельных таблеток цифетрелина приведены в табл. 2.

При оценке подлинности таблеток цифетрелина раствор лекарственной формы цифетрелина в 95 %-ном этиловом спирте имел выраженный максимум поглощения (как и РСО) при λ 282 нм (см. рис.). Предварительно установлено, что зависимость оптического поглощения раствора цифетрелина в 95 %-ном этиловом спирте от концентрации подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера. При проведении количественного определения содержания цифетрелина в наработанной серии таблеток установлено, что среднее содержание цифетрелина составляет 0,0058 г.

По результатам оценки качества модельных таблеток цифетрелина был сделан вывод, что предложенный состав лекарственной формы обеспечивает соответствие показателей качества лекарственной формы требованиям ГФ XI. Таблетки цифетрелина наработанной серии были использованы в исследовании противоопухолевой активности *in vivo*.

Исследование противоопухолевой активности таблеток цифетрелина.

При сравнении противоопухолевого действия цифетрелина в субстанции и таблетках при пероральном введении в изученных режимах в дозе 10 мг/кг и 1 мг/кг установлено, что по показателю ТРО эффективность модели лекарственной формы цифетрелина не уступала таковой субстанции (табл. 3). Во всех группах животные начинали гибнуть позже, чем в контрольной группе, ни в одной из групп животных не наблюдалось изменения макроскопической картины внутренних органов или снижения массы тела более чем на 20 %. Вывод: цифетрелин нетоксичен.

Полученные результаты свидетельствуют, что использованные при получении таблеток цифетрелина вспомогательные вещества не снижают его биодоступность и противоопухолевый эффект при пероральном введении.

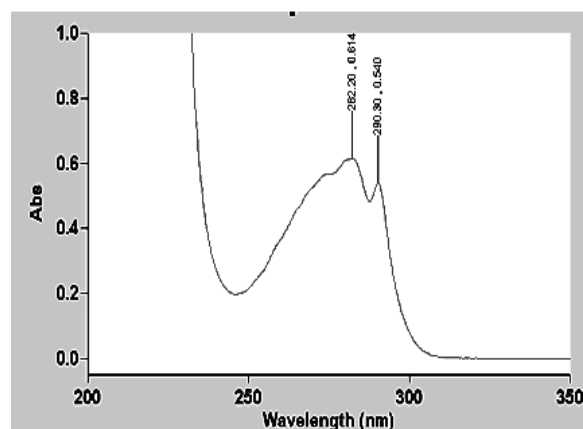
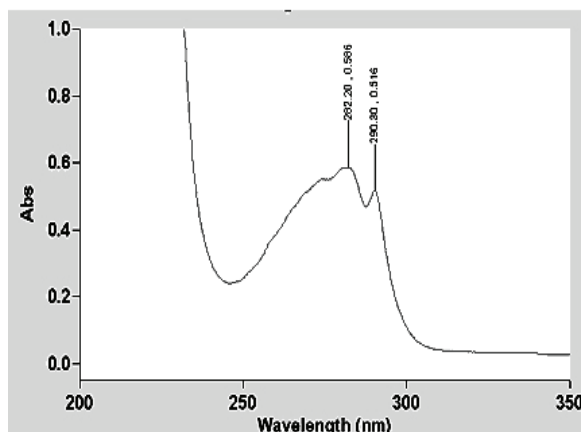


Рис. Спектры поглощения раствора таблеток цифетрелина

А: в 95 %-ном спирте этиловом;

Б: РСО цифетрелина относительно раствора сравнения в УФ-области

Таблица 1

Модельные смеси для таблетирования цифетрелина

№	Модельные смеси для таблетирования (в расчете на 1 таблетку)	Результат
1	Цифетрелина – 0,006 г Лактозы – 0,055 г Целлюлозы микрокристаллической – 0,010 г Крахмала – 0,025 г Опудривающей смеси – 0,010 г	Таблетлируемая смесь прессуется, поверхность таблеток без сколов, глянцевая. Распадаемость 11–13 мин, прочность на радиальное сжатие 1,6 МПа.
2	Цифетрелина – 0,006 г Лактозы – 0,050 г Целлюлозы микрокристаллической – 0,010 г Крахмала – 0,025 г Поливинилпирролидона – 0,005 г Опудривающей смеси – 0,010 г	Таблетлируемая смесь прессуется, таблетки не расслаиваются, без сколов. Распадаемость 12–13 мин, прочность на радиальное сжатие – 1,0 МПа.
3	Цифетрелина – 0,006 г Лактозы – 0,055 г Целлюлозы микрокристаллической – 0,010 г Крахмала – 0,020 г Поливинилпирролидона – 0,005 г Опудривающей смеси – 0,010 г	Таблетлируемая смесь прессуется, таблетки хорошего качества, не расслаиваются, края некоторых таблеток имеют небольшие сколы. Распадаемость 3–4 мин, прочность на радиальное сжатие – 0,63 МПа.
4	Цифетрелина – 0,006 г Лактозы – 0,055 г Целлюлозы микрокристаллической – 0,005 г Крахмала – 0,025 г Поливинилпирролидона – 0,005 г Опудривающей смеси – 0,010 г	Таблетлируемая смесь прессуется, таблетки хорошего качества, поверхность глянцевая, края ровные, без сколов. Распадаемость 7–9 мин, прочность на радиальное сжатие 0,88 МПа.
5	Цифетрелина – 0,006 г Лактозы – 0,050 г Целлюлозы микрокристаллической – 0,010 г Крахмала – 0,020 г Поливинилпирролидона – 0,005 г Аэросила – 0,005 г Опудривающей смеси – 0,010 г	Таблетлируемая смесь прессуется, таблетки хорошего качества, не расслаиваются, поверхность таблеток приобрела мраморность. Распадаемость 9–11 мин, прочность на радиальное сжатие 0,63 МПа.

Таблица 2

Показатели качества таблеток цифетрелина

Показатель	Требования ГФ XI	Результаты оценки модельных таблеток цифетрелина
Описание (внешний вид)	–	Круглые таблетки белого цвета с глянцевой поверхностью, двояковыпуклые, с ровными, без сколов краями, без запаха
Средняя масса таблетки	0,925 – 0,1075 г	0,1059
Отклонение в средней массе	±7,5%	± 5,5
Однородность дозирования	±15%, ни в одной таблетке более ±25%.	от -7 до +9.
Распадаемость	не более 15 минут для таблеток без оболочки	не более 9 минут
Прочность на истирание	не менее 97 %	99 %
Растворение	не менее 75 % за 45 мин. в воде	не менее 96 % за 45 мин в 95 %-ном спирте этиловом
Количественное содержание лекарственного вещества в таблетке	5,4 – 6,6 мг	5,8 мг

Таблица 3

Противоопухолевое действие субстанции и таблеток цифетрелина на модели опухоли РШМ-5 при пероральном введении в различных режимах

Доза, мг/кг	Режим дозирования	Таблетки/ субстанция	% ТРО, дни после перевивки опухоли					
			7	11	14	18	22	25
10	5 дней с интервалом 24 ч, 1 курс	Субстанция	90*	80*	76*	75*	67*	54
		Таблетки	84*	82*	87*	74*	60*	56
	5 дней с интервалом 24 ч, 2 курса с интервалом 7 дней	Субстанция	77*	82*	88*	91*	79*	78*
		Таблетки	70*	76*	73*	50	63*	59*
	1 раз в неделю в течение 3 недель	Субстанция	79*	74*	56	62*	66*	–
		Таблетки	88*	92*	82*	67*	69*	70*
1	5 дней с интервалом 24 ч, 2 курса с интервалом 7 дней	Субстанция	70*	61*	69*	79*	68*	53
		Таблетки	80*	89*	78*	69*	73*	69*
	10 дней с интервалом 24 ч, 1 курс	Субстанция	59*	69*	51	63*	58*	55
		Таблетки	67*	85*	70*	57*	57*	64*

*достоверно к контролю при $p < 0,05$; «-» – нет данных.

Заключение

Полученные данные показывают возможность создания лекарственной формы цифетрелина в таблетках для перорального введения:

- предложенный состав вспомогательных веществ для таблетирования цифетрелина позволяет получить таблетки, качество которых соответствует требованиям ГФ XI;
- выбранные вспомогательные вещества, входящие в состав таблеток, не мешают высвобождению цифетрелина из ЛФ;

- по противоопухолевой активности таблетки цифетрелина не уступают субстанции цифетрелина при пероральном введении.

Авторы благодарят сотрудников лаборатории химического синтеза и лаборатории химико-фармацевтического анализа НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН за предоставление цифетрелина, ценные консультации и помощь в выполнении настоящей работы.

Литература

- Государственная фармакопея. – XI, Вып. 2. – М.: Медицина, 1998. – 154 с.
- Егоров А.В., Кондрашин С.А., Фоминых Е.В. и др. Аналоги соматостатина в диагностике и лечении нейроэндокринных опухолей. // Анналы хирургической гепатологии. – 2009. – Т. 14, № 4. – С. 1–7.
- Регистр лекарственных средств России РЛС [Электронный ресурс] // Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. – Электрон. данн. – М.: Справочно-информационный портал RLSNET.RU, 2011. – Режим доступа: <http://www.rlsnet.ru/>, свободный. – Загл. с экрана. – Яз. рус.
- Смирнова Л.П., Устинкина С.В., Смирнова А.П. и др. Средство, обладающее противоопухолевым действием. Патент № 2254139 РФ
- De Herder W.W., Lamberts S.W. Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses // Current Opinion in oncology. – 2002. – 14(1). – P. 53–7.
- Frokjaer S. and Otzen D.D. Protein drug stability: a formulation challenge // Nat. Rev. Drug Discov. – 2005. – 4. – P. 298–306.
- Hoffman A., Ziv E. Pharmacokinetic considerations of new insulin formulations and routes of administration // Clinical pharmacokinetics. – 1997. – 33(4). – P. 285–301.
- Jorgensen L., Hostrup S., Moeller E.H., Grohgan H. Recent trends in stabilising peptides and proteins in pharmaceutical formulation – considerations in the choice of excipients // Expert opinion in drug delivery. – 2009. – 6(11). – P. 1219–30.
- Rakhi B. Shah, Fakhru Ahsan, Mansoor A. Khan. Oral delivery of proteins: Progress and prognostication // Critical reviews in therapeutical drug carrier Systems. – 2002. – 19(2). – P.135–69.
- Susini C., Buscail L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumour agents // Annals of Oncology. – 2006. – 17(12). – P. 1733–42.
- Torchilin V.P. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions // Drug discovery today. – 2003. – 8(6). – P. 259–66.
- Weckbecker G., Lewis I., Albert R. et al. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects // Nature Rev. Drug Discovery. – 2003. – 2. – P. 999–1017.

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.

УДК 616.24-006.6-06-085. 277.3

¹Л.И. Корытова, ¹Г.Л. Васильев, ¹В.Ф. Мус, ¹Е.В. Немкова, ^{2,3}Н.Д. Олтаржевская, ^{2,3}М.А. Коровина**ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОСТРЫХ ЛУЧЕВЫХ ЭЗОФАГИТОВ ПРИ ХИМИОЛУЧЕВОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**¹ФГУ «РНЦ радиологии и хирургических технологий» Мининздрава России, Санкт-Петербург²ООО «НПО ТЕКСТИЛЬПРОГРЕСС ИА», Москва³ООО «КОЛТЕКС», Москва**Резюме**

Актуальность: комбинированная химиолучевая терапия с использованием 5-фторурацила и карбоплатина является одним из основных методов консервативной терапии больных нерезектабельным раком легкого. Острый лучевой эзофагит является частым осложнением данной терапии и единой тактики профилактики и лечения его в настоящий момент не существует.

Материалы и методы: всем 49 пациентам, включенным в исследование, была проведена лучевая терапия в режиме динамического фракционирования (4 Гр/сутки (n=2), 3 Гр/сутки (n=4), 2 Гр/сутки (n=15), 1,8 Гр/сутки (n=5-7) до суммарной дозы 60-70 Гр. Больные группы 1 одновременно с лучевой терапией получали карбоплатин по 30 мг/м² (в/в, 3 раза в неделю) и 5-фторурацил – 300 мг/м² (в/в, 2 раза в неделю), группы 2 – карбоплатин – 30 мг/м² (в/в, 3 раза в неделю); группы 3 – 5-фторурацил 300 мг/м² (в/в, 2 раза в неделю). Пациенты всех групп в качестве базового средства профилактики и лечения острого лучевого эзофагита получали масляную суспензию, состоящую из смеси оливкового масла 470,0 мл, масляного раствора витамина А 10,0 мл и масла облепихи – 20,0 мл. Больные группы 1 дополнительно принимали «Колетекс-гель-ДНК-Л». Прием обоих средств осуществлялся в разовой дозе – 5 мл, 4 раза в сутки.

Результаты: применение «Колетекс-гель-ДНК-Л» позволило снизить частоту эзофагитов 3 степени у больных группы 1, несмотря на то, что пациенты данной группы получали синхронное химиолучевое лечение с применением двух химиотерапевтических препаратов – 5-фторурацила и карбоплатина.

Ключевые слова: рак легкого, лучевой эзофагит, лучевая терапия, химиолучевое лечение.

¹Korytova L.I., ¹Vasiliev G.L., ¹Mus V.F., ¹Nemkova E.V., ^{2,3}Oltarzhevskaya N.D., ^{2,3}Korovina M.A.**PREVENTIVE AND TREATMENT ACUTE RADIATION-INDUCED ESOPHAGITIS IN PATIENTS WITH LUNG CANCER, UNDERGO COMBINED CHEMO-RADIOTHERAPY**¹Russian science center of radiology and radiosurgery, Spb, Russia²ООО "NGOs TEKSTILPROGRESS IA", Moscow³ООО "KOLETEKS", Moscow**Abstract**

Background: Combined chemo-radiation therapy with 5-FU, carboplatin is the main method of therapy for unresectable lung cancer. Radiation-induced esophagitis is the most frequent complication of chemo-radiation therapy, which is not solved yet.

Patients and methods: The radiotherapy with dynamic dose fractionation has been used to treat all 49 patients (4 Gy/day n=2, 3 Gy/day n=4, 2 Gy/day n=15, 1.8 Gy n=5-7) to effective total dose of 60-70 Gy at primary lesion. In group I, we used concurred chemotherapy with 5-FU – 300 mg/m² (2 times a week) and carboplatin – 30 mg/m² (3 times a week), in group II patients received only carboplatin and in group III only 5-FU at the same mode as in first group. Butyric suspension (sea buckthorn oil – 20 ml, oil solution of vitamin A – 10 ml, olive oil to 500 ml) was used for prevention and treatment of radiation-induced esophagitis. Patients of first group also used Koletex-gel-DNA-L. Butyric suspension and Koletex-gel-DNA-L used in single dose of 5 ml, 4 times per day.

Results: The use of Koletex-gel DNA-L has reduced the incidence of grade 3 esophagitis in patients in group I, despite the fact that the patients of this group received chemo-synchronous treatment with two chemotherapy drugs: 5-FU and carboplatin.

Key words: cancer of lung, radiation esophagitis, radiation therapy, chemo-radiation therapy.

Введение

Рак легкого (РЛ) в настоящий момент является одной из самых распространенных злокачественных опухолей и ведущей причиной смерти от злокачественных новообразований. Ежегодно в мире регистрируется 1,2 млн. новых случаев заболевания.

В России по данным за 2010 раком легкого заболевает свыше 46 000 человек в год, что в структуре общей онкологической заболеваемости составляет около 11 %. В структуре заболеваемости мужчин РЛ составляет 19,5 %, женщин – 3,8%. В структуре заболеваемости мужчин в возрасте 30-59 лет новообразования легкого занимают первое место (20,9 %), дан-

ная тенденция сохраняется и в возрасте 60 лет и старше (19,4 %) [3].

Химиолучевое лечение сопровождается рядом осложнений, одним из которых является острый лучевой эзофагит. При проведении конвенциональной лучевой терапии рака легкого в той или иной степени выраженности он проявляется у всех больных. Схемы лечения и профилактики данного осложнения в настоящий момент недостаточно разработаны [7].

Наиболее распространенным и эффективным методом консервативного лечения неоперабельного местно-распространенного рака легкого является лучевая терапия, которая в традиционном, классическом варианте, не обеспечивает приемлемых результатов [1].

По данным научной литературы, частота острого лучевого эзофагита при проведении самостоятельной лучевой терапии больным раком легкого на различных высокоэнергетических аппаратах, составляет от 12,4 до 30% [2; 11].

Харченко В.П. и соавт. (2007) также полагают, что лучевой эзофагит является самым распространенным осложнением, которое в той или иной мере возникает у всех без исключений больных при лучевом лечении злокачественных новообразований средостения, независимо от величины подведенной дозы. Развитие его обусловлено анатомической близостью данных опухолей с пищеводом и невозможностью полностью его исключения из 90 % изодозного поля [5].

Для повышения эффективности лучевого лечения данной категории больных наряду с эффективностью различных вариантов фракционирования, суммарных доз, объемов облучения, проводится поиск возможности добавления химиотерапевтических препаратов, режимов их введения, допустимых доз.

Частота острых лучевых эзофагитов при проведении синхронной химиолучевой терапии, по данным литературы составляет от 8–49 % [10; 13].

Поэтому в настоящий момент наряду с поиском оптимальной схемы синхронной химиолучевой терапии не менее актуален поиск путей профилактики и лечения лучевых осложнений, в частности – острого лучевого эзофагита.

На сегодня известно несколько способов профилактики и лечения лучевых эзофагитов: физический, механический, медикаментозный.

1. Физический метод подразумевает уменьшение объема облучения, использование методики сплит-курсов. Клинические данные об эффективности расщепленного курса дистанционной лучевой терапии показывают уменьшение частоты ранних и поздних лучевых повреждений. Однако при этом не происходит увеличения средней продолжительности жизни больных, а в ряде исследований отмечено ее уменьшение, по-видимому, за счет репопуляции клоногенных опухолевых клеток, особенно в тех исследованиях, когда перерыв превышает 10–14 дней.
2. Механический метод – диета, исключающая кофе, горячие напитки, острую пищу, цитрусовые фрукты и соки, томаты, алкоголь и табак, т.е. те продукты, которые при прохождении по пищеводу могут еще сильнее травмировать слизистую оболочку. Пациентам в процессе прохождения лучевого или химиолучевого лечения рекомендуется потреблять мягкую, протертую пищу, с низкой кислотностью.
3. Эффективность медикаментозного способа профилактики и лечения острого лучевого эзофагита.

Komaki et al. из Техасского университета установили снижение частоты развития острого эзофагита с 31 до 7,4 % у 60 пациентов, получавших и не получающих амифостин при комбинированном лечении рака легкого [8].

Koukourakis et al. (1999), Sprinzel et al. (2001) опубликовали данные, согласно которым пероральное применение водного раствора рЧГМ-КСФ уменьшает частоту лучевых эзофагитов III–IV степени. Однако у 9 пациентов после его применения, установлено усиление выраженности симптомов острого лучевого эзофагита [9; 12].

Таким образом, в настоящий момент не предложено оптимальной схемы профилактики и лечения

острого лучевого эзофагита при лучевой и химиолучевой терапии больных местно-распространенным раком пищевода.

Цель исследования: профилактика и лечения острого лучевого эзофагита у больных раком легкого, получающих химиолучевое лечение.

Задачи исследования: изучение частоты, степени тяжести и сроков возникновения острых лучевых эзофагитов у больных раком легкого, получающих химиолучевое лечение в различных комбинациях химиотерапевтических препаратов с учетом способа профилактики эзофагита.

Материалы и методы

Медицинская документация и клинические наблюдения за 49 больными раком легкого II–III стадий, которым проводилась лучевая терапия в радикальных дозах в ФГУ РНЦРХТ с 2000 по 2010 г. включительно, ср. возраст 64,4 года (46÷81). Среди больных было 4 женщины (8,1%) и 58 мужчин (91,9%).

Распределение по стадиям:

II – 22 пациента (44,9%),

III

A – 12 пациентов (24,5%)

B – 15 больных (30,6%).

Формы опухолей:

ПКР – 40 больных (81,7%),

аденокарцинома – 6 больных (12,2%),

МРЛ – 3 пациента (6,1%).

Всем больным была проведена лучевая терапия в радикальных дозах на линейных ускорителях SL 75-5 с граничной энергией тормозного излучения 6 МэВ. В зону воздействия ионизирующего излучения включали первичную опухоль и пути регионарного метастазирования – лимфатические узлы корня пораженного лёгкого, лимфатические узлы средостения, лимфатические узлы корня противоположного лёгкого (в случае их поражения). Шейно-надключичные лимфоузлы входили в объём облучения при локализации опухоли в верхних долях или в нижней доле левого лёгкого, при поражении всех групп лимфоузлов средостения или надключичных лимфоузлов. При облучении обеих надключичных областей проводили экранирование гор-тани. Подготовка больных к проведению лучевой терапии выполнялась на рентгеновском симуляторе EDR–750.

Границы поля превышали на 2 см рентгенологически определяемые края опухоли и увеличенных лимфоузлов. Верхняя граница поля облучения доходила до яремной вырезки, нижняя – не менее 3 см ниже бифуркации трахеи, внутренняя проходила по границе медиастинальной плевры противоположной стороны или включала противоположный корень при его поражении. Ателектазированная часть лёгкого входила в зону облучения в минимально необходимом объёме. На фронтальных топометрических рентгенограммах обозначали границы запланированного радиационного поля с маркировкой центра поля и расположения защитных блоков. Перед началом и в процессе лечения выполнялся рентгенологический контроль точности укладок в рабочем пучке ускорителя.

Облучение проводилось в ритме 2 : 1 (спереди: сзади – для снижения дозы на спинной мозг), в режиме динамического фракционирования. Доза за фракцию менялась на протяжении курса облучения (РОД 4 Гр – 2 фракции, РОД 3 Гр – 4 фракции, РОД 2 Гр – 15 фракций). Суммарная очаговая доза на лимфатические узлы средостения составляла 50 Гр (эквивалентно 55 Гр обычного фракционирования согласно линейно-квадратичной модели).

Затем проводилось переформирование полей с уменьшением объема облучения до размеров первичного очага с полным исключением из поля облучения спинного мозга и, по возможности, других критических органов. Суммарная очаговая доза за полный курс терапии 60–70 Гр.

В зависимости от методики лечения и профилактики острого лучевого эзофагита пациенты были распределены на 3 группы (табл. 1). Лучевая терапия проводилась на фоне синхронной химиотерапии.

Нами предложен способ профилактики острого лучевого эзофагита, ранее положительно зарекомендовавший себя в профилактике мукозитов при лечении орофарингеального рака [4], включающий применение стандартной масляной эмульсии и препарата «Колетекс-гель-ДНК-Л» (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00894 от

15.10.2007 г, торговое название «Колегель»™ (гидрогелевый материал) с деринатом (дезоксирибонуклеатом натрия).

Данный препарат представляет собой биополимерную основу на основе альгината натрия и содержит в составе деринат и 2 %-ный лидокаин.

Входящий в «Колетекс-гель-ДНК-Л» деринат обладает неспецифическим общебиологическим стимулирующим действием на органы и ткани, нормализует иммунный статус пациентов, стабилизирует гемопоэз, усиливает регенерацию тканей. Дополнение гидрогелевой композиции лидокаина снимает спазм периферических сосудов, способствует снятию болевого синдрома.

Альгинат натрия ускоряет восстановление тканей и способствует предотвращению и снижению кровоточивости.

Таблица 1

Распределение больных раком легкого в группах в зависимости от метода лечения и способа профилактики острого лучевого эзофагита

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Количество больных	25	11	13
Лучевая терапия	Динамическое фракционирование		
Химиотерапия	Карбоплатин + 5-фу	Карбоплатин	5-фторурацил
«Колетекс-гель-ДНК-Л»	Да	Нет	Нет
Суспензия: масляный р-р вит. А – 10,0; масла облепихи – 20,0; Оливковое масло до 500			

Таблица 2

Степень тяжести острого лучевого эзофагита у больных раком легкого в зависимости от метода лечения и способа профилактики острого лучевого эзофагита

Степень	Группа 1	Группа 2	Группа 3
0	0	2 (18,2%)	0
I-II	18 (72,0%)	7 (63,6%)	5 (38,5 %)
III	7 (28,0%)	2 (18,2%)	8 (61,5%)
Кол-во больных	25	11	13

Больные группы 1 (25 человек) одновременно с лучевой терапией получали карбоплатин – 30 мг/м² (в/в, 3 раза в неделю) и 5-фторурацил – 300 мг/м² (в/в, 2 раза в неделю), группы 2 (11 человек) – карбоплатин – 30 мг/м² (в/в, 3 раза в неделю); группы 3 (13 человек) – 5-фторурацил 300 мг/м² (в/в, 2 раза в неделю). Пациенты всех групп получали масляную суспензию (см. выше). Больные группы 1 дополнительно принимали «Колетекс-гель-ДНК-Л», который назначался 4 раза в сутки по 5 мл перорально. Группы были сопоставимы по полу, возрасту, клинической стадии заболевания, объемам облучения, отличались друг от друга только проводимым лечением (химиотерапия и профилактика эзофагита). Диагноз острого лучевого эзофагита устанавливался на основании жалоб пациента на боль при глотании, затруднения при глотании твердой и жидкой пищи, боль за грудиной, изжогу. Степень эзофагита определялась в соответствии со шкалой токсичности CTC NCIC [6]. Статистическая обработка материала проводилась с применением пакета программ Statistica 6.0. Сравнение различий показателей осуществляли с применением критерия Стьюдента, метода четырехпольных таблиц и непараметрического критерия Фишера.

Результаты

Запланированная программа химиолучевой терапии была полностью выполнена всем больным. У 2 больных группы 1, в связи с возникновением гематологических осложнений (лейкопения III степени) был сделан перерыв в лечении на 1 неделю, до нормализации показателей периферической крови. У 47 пациентов (95,9%) развился острый луче-

вой эзофагит различной степени, эзофагит I-II степени выявлен у 30 пациентов (61,2%), III степени – у 17 (34,7%). Проанализирована частота и тяжесть развития эзофагитов в группах в зависимости от метода лечения и способа профилактики.

В группе 2 количество эзофагитов оказалось несколько меньше, чем в группах 1 и 3 – 81,8 в сравнении с 100%, различия недостоверны. При анализе указанных в табл. 2 данных выявлено, что в группе 2 было больше больных, у которых симптомов не развилось – 18,2 в сравнении с 0% (2 против 0) в группах 1 и 3 ($p \leq 0,05$).

Также в этой группе было достоверно меньше эзофагитов 3 степени (2 (18,2%) против 7 (28,0%) в группе 1 и 8 (61,5%) в группе 3) ($p \leq 0,05$). Скорее всего, тяжесть эзофагитов в группах 1 и 3 обусловлена включением в схему лечения 5-фторурацила, известного своей токсичностью для слизистых оболочек.

Обращает на себя особое внимание тот факт, что в группе 1, несмотря на то, что пациенты в ней получали заведомо более токсичное лечение (комбинация 5-фторурацила и препаратов платины), в связи с дополнительным приемом «Колетекс-гель-ДНК-Л» было достоверно меньше эзофагитов 3 степени (7 (28%) против 8 (61,5%), $p \leq 0,05$), чем в группе 3. Проведен анализ зависимости сроков возникновения эзофагитов от суммарной дозы облучения. Средняя СОД оценивалась по динамике ежедневных жалоб пациентов в процессе лечения. В группе 3 отмечено несколько более раннее появление симптомов эзофагита ($30,6 \pm 2,1$ Гр против $38,6 \pm 2,3$ Гр в группах 1 и 2), однако достоверных различий не было.

Заключение

Применение «Колетекс-гель-ДНК-Л» позволило снизить частоту эзофагитов III степени у боль-

ных группы 1, несмотря на то, что пациенты данной группы получали синхронное химиолучевое лечение с применением двух химиотерапевтических препаратов – 5-фторурацила и карбоплатина.

Литература

1. Бойко А.В., Черниченко А.В., Мещерякова И.А. и соавт. Лучевая терапия немелкоклеточного рака легкого // Практич. онкол. – 2000. – № 3. – С.24–8
2. Золотков А.Г., Мардынский Ю.С., Гулидов И.А. и соавт. Повышение эффективности лучевой терапии рака легкого: клинические и экономические проблемы // Радиол. – практ. – 2008. – № 3. – С. 16–20
3. Злокачественные новообразования в России в 2010 году. / под. ред. В.И.Чиссова, В.В. Старинского, Г.В.Петровой. - М:ФГБУ «МНИОИ им. П.А.Герцена Росмедтехнологий». - 2012. - С.260
4. Корытова Л.И., Сокуренок В.П., Масленникова А.В. Современные тенденции в терапии местнораспространенного рака ротоглотки и полости рта. / под ред. А.М. Гранова. – СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2011. – С. 85.
5. Харченко В.П., Панышин Г.А., Сотников В.М. и соавт. Консервативное лечение злокачественных новообразований трахеи // Радиол. Практ. – № 3. – 2008. – С. 16-20
6. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний./ Под ред. Н.И.Переводчиковой. - 2-е изд., доп. - М: Практическая медицина, 2005. – С. 672-93.
7. Симптоматическая терапия в онкологии. /Под ред. М.Л. Гершановича и В.А. Филова. – СПб: NIKA, 2007. – С.266–7.
8. Komaki R., Cox J.D., Hartz A.J. et al. Characteristics of long term survivors after treatment for inoperable carcinoma of the lung // Am. J. Clin. Oncol. – 1985. – Vol. 8. - (5). – P. 362–70.
9. Koukourakis MI, Flordellis CS, Giatromanolaki A et al. Oral administration of recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor in the management of radiotherapy-induced esophagitis // Clin. Cancer Res. – 1999. – Vol. 5. P. 3970–6.
10. Lepke R.A., Kibshitz H.I. Radiation-induced injury of the esophagus // J. Radiol. – 1993. – Vol. 148. – P. 375–8.
11. Singh A.K., Lockett M.A., Bradley J.D. Predictors of radiation-induced esophageal toxicity in patients non-small cell lung cancer treated with three-dimensional conformal radiation therapy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2003. – Vol. 55. – P. 337–41.
12. Sprinzl G.M., Galvan O., de Vries A. et al. Local application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for the treatment of oral mucositis // European J. of Canc. – 2001. – Vol. 37. – P. 20039.
13. Vokes E.E., Leopold K.A., Herndon J.E. et al. A randomized phase II study of gemcitabine or paclitaxel or vinorelbine with cisplatin as induction chemotherapy and concomitant chemoradiotherapy for unresectable stage III non-small lung cancer (CALGB Study 9431) // Proc Am Soc Clin Oncol. – 1999. – Vol. 18. – P. 459a.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 577.352.2:612.014.482

Т.В. Михайлова¹, М.А. Барышникова¹, Н.С. Багирова¹, Н.В. Дмитриева¹, В.Р. Дуфлот², А.Ю. Барышников¹**СТЕРИЛИЗАЦИЯ МНОГОСЛОЙНЫХ ПРОТЕОЛИПОСОМ**¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва²Филиал ФГУП «НИФХИ им. Л.Я. Карпова», Обнинск**Контактная информация:**

Барышникова Мария Анатольевна, канд. фарм. наук, старший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм

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

e-mail: ma_ba@mail.ru

Статья поступила: 16.01.2012; подписана в печать: 18.01.2012

Резюме

Цель работы – исследование возможности использования γ -облучения для стерилизации лиофильно-высушенных многослойных протеолипосом.

Лиофильно-высушенный липосомальный препарат, содержащий лизат клеточных линий меланомы человека, облучали на источнике ⁶⁰Со дозами 5; 12; 17 и 25 кГр. Оптимальная доза γ -облучения протеолипосом составила 12 кГр, т.к. при этом обеспечивается стерильность и сохраняются основные физико-химические показатели липосомального препарата.

Методами оптической и электронной микроскопии показано, что после γ -облучения дозой 12 кГр форма, размер и структура многослойных протеолипосом не изменились. Методом иммуноблот показано, что после γ -облучения лиофильно-высушенных протеолипосом стабильность белка hsp-70 и высокая степень загрузки лизата в липосомы сохранились. Полученные результаты служат основанием для применения гамма-облучения при стерилизации липосомальных препаратов.

Ключевые слова: γ -облучение, липосомальные вакцины, стерилизация, физико-химическая стабильность.

T.V. Mikhailova¹, M.A. Baryshnikova¹, N.S. Bagirova¹, N.V. Dmitrieva¹, V.R. Duflo², A.Yu. Baryshnikov¹**STERILISATION OF MULTILAYER PROTEOLIPOSOMES**¹FBSI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow²Branch of L.Ya. Karpov Research Physical-Chemical Institute, Obninsk**Abstract**

The aim of this work was to investigate the possibilities and limitations of gamma-irradiation as a sterilization method for freeze-dried multilayer proteoliposomes.

Freeze-dried liposomes with cell lines lysate mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Is, mel Z were irradiated by ⁶⁰Co source with doses of 5; 12; 17 and 25 kGy. The optimal dose of γ -irradiation was 12 kGy as while ensuring sterility preserved basic physical and chemical properties of multilayer proteoliposomes.

No changes in liposomal shape, size and structure were registered after γ -irradiation with dose of 12 kGy as demonstrated by optical and electron microscopy. Immunoblot method showed that after γ -irradiation of freeze-dried liposomes stability of the protein hsp-70 and a high degree of loading of the lysate into liposomes was preserved. The results obtained provide the basis for application of γ -irradiation sterilization of liposomal vaccines.

Keywords: γ -irradiation, liposomal vaccines, sterilization, chemical and physical stability.

Введение

Получение и применение липосомальных лекарственных форм препаратов – активно развивающаяся область в фармации и медицины. Способность липосом включать в себя различные вещества практически без каких-либо ограничений в отношении их химической природы, свойств и размера молекул дает поистине уникальные возможности для решения многих медицинских проблем [1]. В 1971 г. впервые была произведена попытка создания протеолипосом путем включения в липосомы вещества белковой природы. Включенные в готовые липосомы путем простой инкубации альбумин, инсулин, иммуноглобулины оставались связанными с ними даже после гель-фильтрации, что свидетельствует о прочной ковалентной связи между ними [3].

Примером многослойных липосом, нагруженных антигенным материалом, могут служить липосомы, содержащие мембранные белки клеток

лимфомы, липосомы, содержащие очищенный мембранный протеин *N. meningitidis*, липосомы с кадгерином, многослойные липосомы, содержащие полисахаридный антиген и белковый адъювант. Во всех примерах было показано, что липосомы являются средством доставки, обеспечивающим сохранность антигена и вызывающим иммунный ответ, что дает возможность применять протеолипосомы в качестве вакцин.

К сожалению, липосомальные лекарственные формы обладают рядом недостатков. Одним из них является сложность стерилизации липосом с помощью большинства методик в связи с деградацией липидов.

Липосомы, взаимодействующие с клетками, органами и тканями организма, должны быть стерильны. В настоящее время принятым производителем стандартом для процесса стерилизации является вероятность нахождения нестерильных единиц менее, чем 1 на 1 млн. что обеспечивает SAL, точность которого равна более чем 10⁻⁶ [3].

Учитывая высокую лабильность бислойной липидной мембраны, применение многих традиционных методов стерилизации оказывается невозможным, так как при воздействии высоких температур или некоторых органических растворителей-дезинфектантов липосомы разрушаются. Существует несколько способов стерилизации фармацевтических препаратов.

1. Автоклавирование – метод выбора для водных препаратов по Европейской Фармакопее, однако в связи со слабой физической и химической стабильностью при нагревании, для большинства липосомальных дисперсий обычно рекомендуется стерилизация фильтрацией или асептические условия приготовления [5]. Следует учесть: если размер липосом превышает 0,22 мкм, метод фильтрации не может быть использован для стерилизации липосомальных препаратов [7]. Асептика на всех этапах производства (стерильные условия, оборудование, материалы) требует высоких материальных затрат.
2. γ -облучение. В ранних исследованиях приводились данные о повреждении липосомальных систем после γ -облучения, включая липосомы, состоящие из насыщенных фосфолипидов в инертной атмосфере. Поэтому указанный метод стерилизации долго время не использовался [2].

Тем не менее, в ряде дальнейших исследований [6] было показано, что стерилизация облучением не вредит сохранности липидов при облучении лиофильно-высушенных липосомальных препаратов. Гидроксильные радикалы, появляющиеся в результате воздействия излучения на воду, являются основным источником свободных радикалов, наносящих повреждения, поэтому содержание воды играет ключевую роль в стабильности липосом в процессе γ -стерилизации. Исследования *N.J. Zuidam et al.* показали: сублимационная сушка липосом не только способствует повышению стабильности, но и обеспечивает подавление нежелательных изменений, индуцированных в процессе облучения [8].

Применение γ -стерилизации позволяет сохранить химическую целостность липидов и физико-химические свойства препарата, заключенного в липосомы, тем самым способствуя переходу липосомальных препаратов из лаборатории в клинику [2].

Материалы и методы

Получение лизатов клеточных линий меланомы

Клетки линий *mel P*, *mel Kor*, *mel Mtp*, *mel Is*, *mel Z* из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН культивировали в полной питательной среде RPMI 1640 с 10 %-ной ТЭС. Для получения опухолевого лизата 10 млн клеток в физиологическом растворе разрушали 5 циклами замораживания в жидком азоте и оттаивания при $t=40^{\circ}\text{C}$. Разрушенные клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 3000 g). Супернатант отбирали и использовали для постановки электрофореза по стандартной методике [4]. Анализируемые белки растворяли в буфере для проб, на каждую дорожку наносили 20 мкг белка. После окончания электрофореза гель извлекали и использовали для переноса на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma).

Получение многослойных протеолипосом с клеточным лизатом

Многослойные протеолипосомы готовили следующим образом: навески лецитина и холестерина (мольное соотношение компонентов 3 : 1) растворяли в небольшом объеме хлороформа. Для предотвращения окисления липидов добавляли антиоксидант – α -токоферола ацетат в количестве 0,01 % от общего количества липидов.

Полученную смесь липидов выдерживали, периодически помешивая, до полного растворения липидов, после чего колбу присоединяли к ротаторному испарителю и на водяной бане при температуре $+40^{\circ}\text{C}$ и пониженном давлении, создаваемым водоструйным насосом, проводили выпаривание хлороформа. После полного удаления органического растворителя на стенках колбы образовывалась тонкая пленка фосфолипидов.

В качестве криопротектора использовали сахарозу в концентрации 10 %. Для этого сахарозу растворяли в физиологическом растворе NaCl. Затем к раствору сахарозы прибавляли лизат с концентрацией общего белка 2,5 мг/мл. После чего липидную пленку смывали этим раствором со стенок колбы до образования белой эмульсии (дисперсия многослойных липосом). Включение лизата проходило по принципу пассивной загрузки.

Лиофилизация многослойных протеолипосом

Для стабилизации протеолипосом проводили сублимационную сушку. 2 мл липосомальной дисперсии во флаконах вместимостью 20 мл из стекла HC-1 помещали на полку в камеру сублимационной установки CHRIST GAMMA 2-16 LSC для замораживания и последующей лиофилизации (толщина слоя 6–7 мм).

Препарат загружали на полки сублимационной камеры при температуре $+20^{\circ}\text{C}$, охлаждали их до температуры -70°C и минимальном давлении в камере $(4,0-6,0)\times 10^{-2}$ мБар в течение 3 ч, далее нагревали от -70°C до $+20^{\circ}\text{C}$ со скоростью 4–5 $^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. После достижения препаратом температуры $+20^{\circ}\text{C}$ (минимальное давление в камере $4,0\times 10^{-2}$ мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 3 ч. Лиофилизация продолжалась 27 ч. После лиофильного высушивания препарат представлял собой однородный мелкодисперсный порошок, хорошо диспергирующийся в воде.

γ -облучение опытных образцов лиофильно-высушенного препарата

Запаянные флаконы с образцами лиофильно-высушенных липосом – как нагруженных клеточным лизатом, так и пустых – облучали на γ -установке К-200000 с источниками ^{60}Co с варьируемой мощностью дозы 0,01–2 Гр/с. Дозиметрию проводили ферросульфатным дозиметром Фрикке.

Оценка стерильности многослойных протеолипосом

Флаконы с лиофилизированным препаратом в завальцованном виде доставлялись в лабораторию микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии НИИ КО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. В лаборатории был сделан посев разведенного физиологическим раствором препарата, затем, сразу после посева, во флаконы были внесены тест-культуры *S. aureus*, *E. Coli*, *C. Albicans*. После γ -облучения проводился посев обработанного препарата.

Стерильность липосом определяли в соответствии с «Методом бактериологического контроля стерильности» по ГОСТ 28085-89. При проверке на бактериологическое загрязнение проводили высевы на среды МПА, МПБ, МППБ, а при исследовании на грибковую контаминацию – на среду Сабуро. О стерильности судили по отсутствию роста микроорганизмов на питательных средах.

Испытуемые образцы проверяли на контаминацию микоплазмами путем посева в пробирки со средой Эдварда (жидкая, полужидкая и плотная). Об отсутствии роста микоплазм в среде судили по сохранению цвета среды.

Определение продуктов деградации лецитина

с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК)

Для определения ТБК-активных продуктов в образцах 1 мл дисперсии липосом переносили в пробирку с притертой пробкой, добавляли 1 мл буферного раствора (0,15M KCl и 10mM Tris-HCl), 0,5 мл 30 %-ной трихлоруксусной кислоты и 1 мл 0,67 %-ного водного раствора ТБК. Полученную смесь интенсивно встряхивали и нагревали на водяной бане с температурой 80 °С в течение 30 мин, затем охлаждали в струе холодной воды до комнатной температуры и центрифугировали 10 мин при $\omega = 3000$ об/мин (225g). Полученный раствор переливали из пробирки в кварцевую кювету и измеряли оптическую плотность на длинах волны 532 нм и 550 нм относительно контрольного опыта (дистиллированной воды). Концентрацию ТБК-активных продуктов определяли по формуле:

$$C = \frac{\Delta OD \times V_{\Sigma}}{\varepsilon \times l} \times V_{пр}, \text{ где}$$

ΔOD – разность оптических плотностей раствора на длинах волн 532 и 550 нм;

V_{Σ} , $V_{пр}$ – суммарный объем и объем пробы соответственно;

ε – коэффициент экстинкции $1,56 \times 10^5$ л/(моль см);

l – толщина кюветы.

Измерения pH

Образцы дисперсий липосом исследовали на pH среды pH-метрами марок Sartorius.

Определение остаточной влажности методом термовзвешивания

Для определения остаточной влажности точные навески препарата помещали в сушильный шкаф при температуре от 50 до 100 °С и сушили до постоянной массы.

Остаточную влажность определяли по разнице веса между исходным и опытным образцом:

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

m_1 – исходный вес образца,

m_2 – вес образца после высушивания.

Определение размера и структуры липосом методами оптической и электронной микроскопии

Размеры протеолипосом определяли методом оптической микроскопии с помощью интерфе-

ренционно-поляризационного микроскопа иммерсионным методом. Использовали оптический микроскоп МРІ-3, увеличение $\times 40$.

Пробу для микроскопирования готовили путем тщательного диспергирования 5 мг препарата в 5 мл инертной дисперсионной среды.

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

Структуру протеолипосом определяли методом электронной микроскопии.

Регидратированный в дистиллированной воде липосомальный лизат (контроль) и липосомальный лизат, облученный дозой 12 кГр (опыт) смешивали 1 : 1 с 1,5 %-ным раствором глутаральдегида в фосфатном буфере.

После 30 мин фиксации при 4 °С липосомальный лизат в количестве 5 мл центрифугировали 1 ч при $\omega = 30000$ об/мин на ультрацентрифуге L-8 Beckman.

Осадок дважды отмывали от фиксатора дистиллированной водой и проводили постфиксацию 2,5% раствором OsO_4 в фосфатном буфере, затем обезвоживали окисью пропилена и этанолом в возрастающих концентрациях и заливали в смесь эпон/аралдит.

Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Austria), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца.

Препараты просматривали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100S фирмы JEOL (Япония) при инструментальном увеличении 10 000–50 000.

Исследование процента нагрузки лизата в липосомы методом гель-хроматографии

Для определения степени нагрузки лизата в липосомы использовали метод эксклюзионной хроматографии.

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

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

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

Хроматографическое разделение препарата проводили на сорбенте Sephadex G-50. Разделение проводили на колонке 1 см $\times$ 16 см при скорости движения элюента (физиологический раствор с pH 7,2) 2мл/мин с детекцией при 280 нм.

В первой фракции содержались липосомы, нагруженные лизатом.

В ходе разделения отбирали нелипидную фракцию, в которой затем спектрофотометрически определяли содержание белка. Эффективность включения лизата в липосомы (В, %) рассчитывали по формуле:

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

D_1 – оптическая плотность раствора фракции с очищенными липосомами с лизатом;

D – оптическая плотность раствора исходной липосомальной дисперсии;

v_1 – объем фракции с очищенным липосомальным лизатом, мл;

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

V_1 – величина разбавления фракции с очищенным липосомальным лизатом;

V – величина разбавления исходной липосомальной дисперсии.

Иммуноблоттинг

Нитроцеллюлозную мембрану с перенесенными белками инкубировали при комнатной температуре в течение часа с 5 %-ным раствором сухого молока Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad) для блокирования неспецифического связывания в буфере Б, состоящем из 2М трис, 0,5М ЭДТА, 5М NaCl; 0,1 %-ного реагента Tween 20 (Bio-Rad). Затем мембрану дважды отмывали в 20 мл буфера Б по 10 мин. Далее проводили инкубацию с антителами Mouse anti-heat shock Protein 70 Monoclonal Ig G (Abfrontier), разведенными в соотношении 1 : 2000 в буфере Б в течение 90 мин. После этого мембрану отмывали дважды по 15 мин в буфере Б. Инкубацию с антителами Blotting Grade Affinity Purified Goat Anti Mouse Ig G Alkaline Phosphatase conjugate (Bio-Rad), разведенными в соотношении 1 : 3000 в буфере Б, проводили в течение 90 мин. Затем мембрану отмывали дважды по 15 мин в буфере Б. Мембрану детектировали с помощью красителя 1 Step NBT/BCIP (Thermo scientific). Результат и степень интенсивности окраски полос фиксировали на приборе Syngene с помощью программы Gene tools.

Результаты и обсуждение

Лиофильно-высушенные протеолипосомы с лизатом клеточных линий меланомы человека mel P, mel Kog, mel Mtp, mel Is, mel Z подвергали γ -облучению дозами 5кГр; 12 кГр; 17 кГр и 25 кГр. В результате посева образцов препарата до стерилизации в некоторых образцах был выявлен рост *Bacillus spp.* Перед стерилизацией во флаконы с протеолипосомами добавляли контрольные тест-культуры микроорганизмов с физиологическим раствором. Результаты посева препарата после внесения тест-культур и последующего облучения представлены в таблице.

При облучении флаконов без препарата, содержащих только питательную среду и контрольные тест-культуры микроорганизмов, при 5 кГр также был зафиксирован рост *C. albicans*. При посеве препарата с тест-культурами микроорганизмов без облучения выявлен рост контрольных микроорганизмов и *Bacillus spp.* Исследование физико-химических характеристик облученных протеолипосом не выявило изменений по сравнению с необлученными протеолипосомами. При сравнении формы и структуры протеолипосом до и после облучения методами оптической (рис. 1; см. вклейку) и электронной (рис. 2) микроскопии не было выявлено значительных изменений. Средний размер протеолипосом, определенный с помощью оптической микроскопии, до и после облучения дозами 5кГр; 12кГр; 17кГр и 25кГр составил 6 мкм. Степень нагрузки липосом белковым лизатом, определенная методом эксклюзионной хроматографии, составила 54% до и после облучения липосом дозами 5кГр; 12кГр; 17кГр и 25кГр. При определении продуктов, дающих характерную реакцию с ТБК, было установлено, что после облучения протеолипосом дозой 12 кГр концентрация МДА не изменилась по сравнению с таковой в необлученных липосомах и составила 1,8 нмоль/мл. После облучения липосом дозами 5 кГр концентрация МДА составила 1,8 нмоль/мл, 17 кГр – 2,1 нмоль/мл, 25кГр – 2,8 нмоль/мл (рис. 3). Остаточная влажность лиофильно-высушенного препарата до и после облучения дозами 5кГр; 12 кГр; 17кГр и 25 кГр не изменилась и составила 1,3%. Показатель pH до и после облучения протеолипосом дозами 5 кГр и 12 кГр составил 5,49. После облучения протеолипосом дозой 17 кГр показатель pH снизился до 4,63; дозой 25 кГр – до 3, 58. Иммуногенность протеолипосом определяли методом иммуноблот по уровню стабильности hsp-70. После анализа программой Syngene было установлено, что уровень hsp-70 после облучения протеолипосом дозой 12 кГр составил 73 % в сравнении с таковым необлученных протеолипосом (контроль; рис. 4). С увеличением дозы облучения количество hsp-70 снижалась по сравнению с контролем: при 5 кГр – 87 %, при 17 кГр – 70 %, при 25кГр – 51 %. γ -облучение лиофильно-высушенного липосомального препарата, содержащего лизат клеточных линий mel P, mel Kog, mel Mtp, mel Is, mel Z, дозами 5; 12; 17 и 25 кГр показало стерилизующее действие дозами от 12 до 25 кГр с сохранением стабильности hsp-70. Оптимальная доза γ -облучения протеолипосом составила 12 кГр, т.к. при этом обеспечивается стерильность и сохраняются основные физико-химические показатели липосомального препарата.

Таблица

Результаты посева протеолипосом после внесения тест-культур и последующего γ -облучения

До облучения (инокуляция)	Дозы облучения				Результат посева после облучения
	5 кГр	12 кГр	17 кГр	25кГр	
<i>S. aureus</i>	■				Роста нет
<i>E. coli</i>	■				Роста нет
<i>C. albicans</i>	■				Рост <i>C. albicans</i> и <i>Bacillus spp</i>
<i>S. aureus</i>		■			Роста нет
<i>E. coli</i>		■			Роста нет
<i>C. albicans</i>		■			Роста нет
<i>S. aureus</i>			■		Роста нет
<i>E. coli</i>			■		Роста нет
<i>C. albicans</i>			■		Роста нет
<i>S. aureus</i>				■	Роста нет
<i>E. coli</i>				■	Роста нет
<i>C. albicans</i>				■	Роста нет

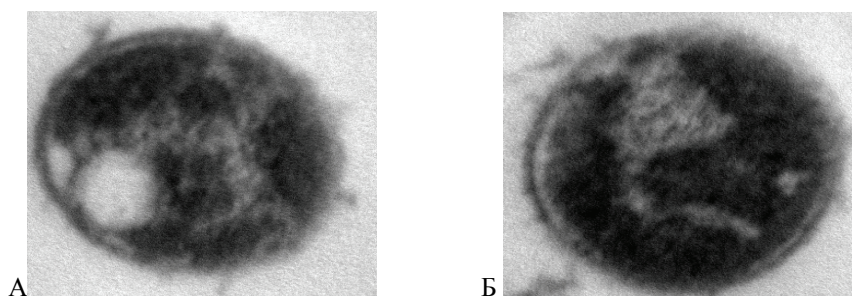


Рис. 2. Электронная микрофотография протеолипосом гамма-облучения дозой 12 кГр. Размер частиц 6 мкм.
А: до; Б: после.

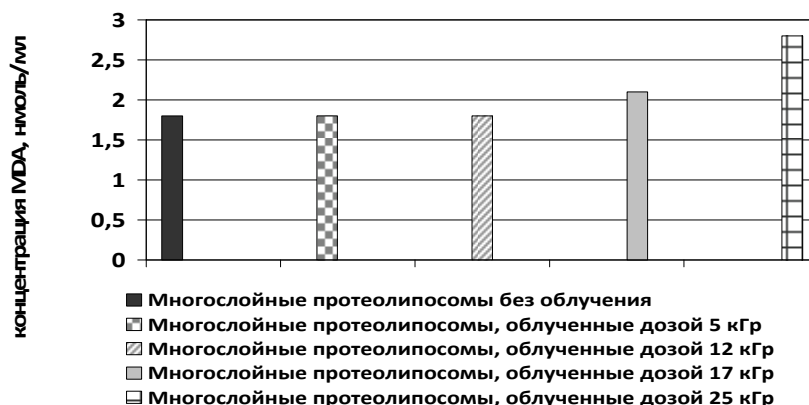


Рис. 3. Определение продуктов деградации лецитина с 2-тиобарбитуровой кислотой.

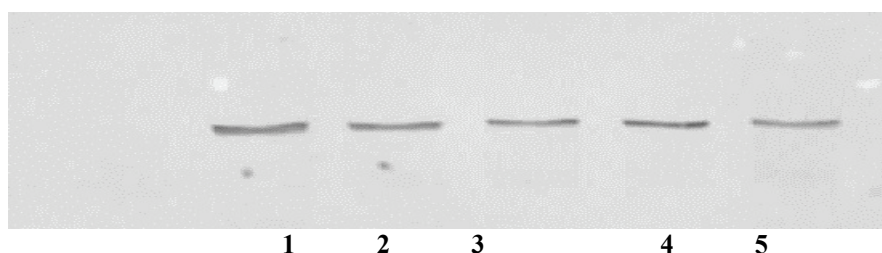


Рис. 4. Уровень hsp-70 в протеолипосомах после γ -облучения (^{60}Co):
1 – контроль (протеолипосомы без облучения); 2 – 5 кГр; 3 – 12 кГр; 4 – 17 кГр; 5 – 25 кГр.

Выводы

Гамма-облучение лиофильно-высушенного липосомального препарата, содержащего лизат клеточных линий mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Is, mel Z, дозами 5; 12; 17 и 25 кГр показало стерилизующее действие дозами от 12 до 25 кГр.

Оптимальная доза гамма-облучения протеолипосом составила 12 кГр, т.к. при этом обеспечивается стерильность и сохраняются основные

физико-химические показатели липосомального препарата.

Методами оптической и электронной микроскопии показано, что после гамма-облучения дозой 12 кГр форма, размер и структура многослойных протеолипосом не изменились.

Методом иммуноблот показано, что после γ -облучения лиофильно-высушенных липосом сохраняются стабильность белка hsp-70 и высокая степень нагрузки лизата в липосомы.

Литература

1. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery progress and problems // *Tibtech*. – 1995. – 13. – P. 527–37.
2. Mohammed A.R., Bramwell V.W., Coombes A.G.A., Perrie Y. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products // *Methods*. – 2006. – 40(1). – P. 30–8.
3. Riaz M. Liposome es preparation methods // *Pakistan Journal of Pharm.Sciences* – 1996. – 19(1). – P. 65–77.
4. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989. – P. 1847.
5. Tardi C., Drechsler M., Bauer K.H., Brandl M. Steam sterilisation of vesicular phospholipid gels // *Int. J. Pharm.* – 2001. – 217. – P. 161–72.
6. Tinsley P.W., Maerker G.J. Isolation and identification of palmitoylphosphocholinepropanediol from. Effect of low-dose gamma-radiation on individual phospholipids in aqueous suspension // *Am. Oil Chem. Soc.* – 1993. – 70. – P. 187–91.
7. Weiner A.L. Liposomes for protein delivery: selecting manufacture and development processes // *Immunomethods*. – 1994. – 4. – P. 201–9.
8. Zuidam N.J., Versluis C., Vernooy E., Crommelin D.J.A. Gamma-irradiation of liposomes composed of saturated phospholipids // *Biophys. Acta (BBA)–Biomembr.* – 1996. – 1280. – P. 135–48.

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 указаным выше требованиям по качеству.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 616-089.843:616-092.9

Н.В. Андропова, М.В. Волконский, М.С. Калшиян, Е.М. Трещалина
**МЕТОДИКА ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОЙ ИНФУЗИИ КРЫСАМ
С ВНУТРИМЫШЕЧНО ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ОПУХОЛЬЮ**
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контактная информация:

Волконский Михаил Викторович, лаборатория комбинированной терапии опухолей НИИ ЭДнТО

e-mail: Mux19@yandex.ru

Статья поступила 10.08.2011, подписана в печать 18.01.2012.

Резюме

В работе описана методика внутриартериальной инфузии различных инъекционных растворов в бедренную артерию крыс с внутримышечно трансплантированной солидной опухолью. Перечислен набор инструментов, дана последовательность операционных процедур и приведены результаты лечения развившейся опухоли цисплатином и доксорубицином. На основании выполненных исследований сделаны рекомендации для практического применения методики в экспериментальной химиотерапии.

Ключевые слова: внутриартериальная инфузия, крысы, бедренная артерия, химиотерапия.

N.V. Andronova, M.V. Volkonsky, M.S. Kalishjan, H.M. Treshalina
**METHOD OF INTRA ARTERIAL INFUSION TO RATS
WITH INTRA MUSCULAR TRANSPLANTED TUMOR**
FBSI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

Abstract

In work the technique of intra arterial infusion various injection solutions in a femoral artery of rats with intramuscularly transplanted solid tumour is described. The tooling is listed, the sequence of operational procedures is given and results of treatment of the developed tumour cisplatin and doxorubicin are resulted. On the basis of the executed researches recommendations for practical application of a technique in experimental chemotherapy are made.

Key words: intraarterial infusion, rats, femoral artery, chemotherapy.

Введение

Внутриартериальная (в/а) инфузия используется при проведении одного из инновационных методов лечения злокачественных новообразований химиоэмболизации. ХЭ сочетает в себе эмболизацию питающей опухоль артерии эмболизирующим материалом, в состав которого введен противоопухолевый препарат [6], например, цисплатин (ЦП) или доксорубицин (Доксо). Использование технических возможностей селективной и суперселективной катетеризации артериальных сосудов под рентгенологическим контролем позволяет производить прицельное введение противоопухолевых препаратов и эмболов, например, микросфер, для локального химиотерапевтического воздействия на новообразование [3; 9; 10].

По сравнению с распространёнными методиками лечения онкологических заболеваний ХЭ имеет ряд преимуществ: возможность воздействия на неоперабельные опухоли и доставка в пораженную зону противоопухолевого агента в более высокой концентрации, обеспечение пролонгированного воздействия химиопрепарата на опухоль, минимальное токсическое воздействие химиопрепарата на организм пациента и минимальный риск возникновения осложнений во время и после процедуры, что обеспечивает низкую травматичность процедуры [4]. Благодаря этим преимуществам ХЭ может эффективно применяться в комплексном лечении онкологических заболеваний наряду с традиционными методиками в режиме предоперационной (неoadъювантной) химиотерапии при лечении неоперабельных опухолей, а также как самостоятель-

ный метод лечения. С появлением современных диагностических комплексов и цифровых способов визуализации, разработкой высокотехнологичных внутрисосудистых инструментов и созданием новых противоопухолевых препаратов и их носителей, эффективность ХЭ становится все более очевидной [12]. Полученные в ходе клинических испытаний данные свидетельствуют о высоких показателях выживаемости пациентов с опухолевыми заболеваниями, что доказывает перспективность ХЭ как современного и эффективного способа лечения рака. Это объясняет значительное повышение популярности методики ХЭ в течение последних лет во всем мире [6; 11; 12].

ХЭ используется при лечении локализованных опухолей, имеющих магистральное кровоснабжение, в частности опухолей печени. Увеличение абсолютной величины доставленной к органу дозы и иммобилизация зоны опухолевого роста при проведении ХЭ приводит к снижению риска рецидивирования и метастазирования при минимальных побочных проявлениях цитостатиков. Использование в/а инфузии в сочетании с лучевой терапией может не только усилить местный контроль над первичной опухолью, но и обеспечить раннее начало системного воздействия на клинически неопределяемые метастазы [5].

Однократное в/а введение противоопухолевых препаратов не нашло широкого применения в клинической практике из-за кратковременности контакта препарата с опухолью, утечки его в общий круг кровообращения и невозможности определения индивидуальной переносимой дозы цитостатика [7; 8].

Однако проведение 2–3 курсов предоперационной химиотерапии через 2–4 недели с использованием однократной в/а 3-часовой инфузии цисплатина в дозе 150 мг/м² оказалось достаточно эффективным: при достижении III–IV степени лечебного патоморфоза в опухоли общая выживаемость больных с выявленными метастазами достигала 44,4 %; а 5-летняя выживаемость без выявленных метастазов – 74,2 %. При лечении рецидивирующих сарком, например, саркомы Юинга, 5-летняя безрецидивная выживаемость была достигнута у 56,3 % больных [1].

Таким образом, актуальность разработки схем предоперационной химиэмболизации с использованием различных эмболизирующих материалов не вызывает сомнений. Для подготовки клинического изучения новых схем химиоэмболизации необходимо адекватное доклиническое изучение. Наиболее близкой моделью регионарного в/а доступа к опухоли для доклинического изучения служит локальное опухолевое поражение органа с магистральным кровоснабжением, например метастазы спонтанного рака молочной железы в печень у собак. Однако эта патология встречается чрезвычайно редко и не может обеспечить достаточную численность групп и воспроизводимость результатов исследования. Среди основных доклинических моделей опухолевого роста, перевиваемых опухолей грызунов, наиболее адекватной являются перевиваемые опухоли крыс, растущие локально в зоне магистрального кровоснабжения, например в печени. Однако печеночная артерия крыс имеет чрезвычайно малую протяженность вне ткани печени, что определяет невозможность восстановления кровотока в аорте после лигирования. Тем не менее, ряд солидных опухолей, в т.ч. холангиоцеллюлярный рак печени крыс, дают стабильный рост в мышцах лапки, кровоснабжаемой из бедренной артерии [8; 11]. Учитывая сложность в/а доступа для моделирования локализованных в печени опухолей на крысах, нами предложена методика в/а инфузии в бедренную артерию, кровоснабжающую зону роста внутримышечно растущей опухоли.

Цель исследования – разработка экспериментальной модели внутриартериальной инфузии для регионарной предоперационной химиотерапии и химиоэмболизации опухолей.

Задачи исследования

1. Разработка методики внутриартериальной инфузии в бедренную артерию крыс.
2. Оценка эффективности внутриартериальной химиотерапии солидной опухоли крыс, привитой в зону кровоснабжения бедренной артерии.

Материалы и методы

Для проведения внутриартериальной терапии выбран холангиоцеллюлярный рак РС-1 на крысах-самцах массой тела 80–120 г из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН [2], который дает локализованный рост при трансплантации в мышцы голени крыс, кровоснабжаемые из бассейна бедренной артерии.

Опухоль охарактеризована как доклиническая модель, пригодная для регионарной терапии [8; 11]. Всего использовано 150 крыс разведенных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и содержали в виварии РОНЦ. Перевивку проводили 25 %-ной взвесью клеток опухоли в питательной среде 199, при-

вивочная доза составила 50 мг/животное. Опухоль перевивали в мышцы голени крысы так, чтобы опухолевые узлы развивались в бассейне кровоснабжения бедренной артерии. После перевивки наблюдали за ростом опухоли, в опыт отбирали крыс с развившимися опухолями, достигшими среднего объема $V_0=3-5 \text{ см}^3$ (12–13 сутки после прививки). Объем опухоли рассчитывали по формуле $V=a \times b \times c$.

Отобранных крыс с измеренными опухолями распределяли по группам лечения ($n=10$), оставляя одну для наблюдения за спонтанной динамикой роста опухоли под контролем в/а инфузии физиологического раствора. Химиотерапию проводили в день вычисления V_0 0,1 %-ным р-ром цисплатина в дозах 0,5 и 1,0 мг на лапку или доксолема в дозе 1,0 мг на лапку.

После лечения за крысами наблюдали до 26-го дня после трансплантации. В этот период у всех крыс многократно вычисляли средний объем опухоли V_t и соотношение V_t/V_0 , определяли время дорастания опухоли до двухкратного объема «т».

Об эффективности судили по коэффициенту эффективности (К), который рассчитывали по соотношению «т» в леченой и контрольной группах. Одновременно следили за побочными реакциями, которые оценивали по развитию отека и местной воспалительной реакции на введение.

Статистическая обработка данных лечения проведена с использованием метода Фишера–Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова.

Результаты

Методика внутриартериальной инфузии

Инструментарий: стерильная инфузионная система «бабочка» с иглой 0,4 – 0,5 мм, шприц объемом 5 – 10 мл, ножницы глазные с закругленными краями, пинцеты глазные хирургические малые, анатомические и шовный материал (хлопчатобумажные неокрашенные нитки N 40), стерилизованные кипячением в дистиллированной воде.

Наркоз: золетил п/к или в/м 25 мг/кг.

Последовательность процедур:

1. Крысы наркотизируются.
2. Начиная от паховой складки на внутренней поверхности бедра выполняется кожный разрез длиной 2 см, затем с помощью ножниц и пинцетов выделяется и лигируется бедренная артерия.
3. В шприц набирается инфузионный раствор, затем шприц соединяется с иглой системы, которая вводится на всю длину в лигированную бедренную артерию и фиксируется лигатурой чуть ниже места введения, после чего с максимальной возможной скоростью выполняется инфузия для заполнения всего бассейна артерии, питающей зону роста опухоли. Контролем заполнения русла служит осветление цвета крови в бедренной вене и небольшое увеличение объема лапки.
4. После завершения инфузии игла извлекается из артерии, рана ушивается непрерывным швом, а лигирующая лигатура максимально укорачивается.

Эффективность внутриартериальной химиотерапии

Эффективность лечения в/м РС-1 с помощью в/а химиотерапии представлена в табл. 1–2.

Таблица 1

Изменение свойств опухоли при однократном в/а введении ЦП и Доксо крысам с в/м РС-1

Группа	Доза, мг на лапку	Vo, см ³	Vt, см ³ на сутки после начала лечения						Побочное действие
			4	8	11	15	20	26	
КРО	–	3,25	5,25	5,18	7,23	11,73	21,13	41,58	Нет
	Vt/Vo	1,0	1,6	1,6	2,2	3,6	6,5	12,8	
ЦП	0,5	2,41	2,33	1,57	1,95	2,11	2,77	4,85	Нет
	Vt/Vo	1,0	0,96	0,65	0,8	0,87	1,1	2,0	
ЦП	1,0	2,83	5,08	2,88	3,30	3,59	2,98	2,65*	Отек 7 дней
	Vt/Vo	1,8	1,01	1,16	1,27	1,05	0,93	–	
Доксо	1,0	3,61	3,13	3,79	4,15	3,81	6,81	16,84	Болезненность
	Vt/Vo	1,0	0,87	1,05	1,15	1,06	1,88	4,66	

Таблица 2

Эффективность цисплатина и доксорубина при однократном в/а введении крысам с в/м РС-1

Доза, мг на лапку	Эффекты	
	Т	К
КРО	9	–
ЦП		
0,5	16	1,8
1,0	Недостижим	>3,0
Доксо 1,0	18	2,0

Видно, что ЦП и Доксо в дозах 0,5 и 1,0 мг/лапку вызывают практически одинаковую длительную задержку роста опухоли ($\tau=16-18$ дней, $K=1,7-2,0$) с минимальным местным действием, максимально проявляющимся в виде кратковременного отека (7 дней) при введении ЦП в дозе 1,0 мг/кг или болезненности при введении Доксо.

Заключение

Предложенная методика внутриартериальной инфузии в бедренную артерию крыс достаточно проста как по инструментальному, так и по техническому обеспечению и атравматична.

Литература

1. Готько Е.С. Внутриартериальная химиотерапия в комбинированном лечении остеогенной саркомы и саркомы Юинга. Автореферат канд. дисс... кандидата мед. Наук – М., 1992 г.
2. Мелюжина Л.Л. Перевиваемый альвеолярный слизистый рак печени крыс РС-1 // Вопросы онкологии. – 1958. – Т. 4, № 5. – С. 600–4.
3. Миронов С.П., Балберкин А.В., Морозов А.К. и др. Артериальная эмболизация в лечении больных с опухолями и опухолеподобными заболеваниями опорно-двигательного аппарата // Вестник травматологии и ортопедии. – 2004. – С. 40–4.
4. Опухоли опорно-двигательного аппарата. – Под ред. Трапезникова Н.Н., вып. 3, М., Медицина, 1971. С. 26.
5. Трапезников Н.Н., Соловьев Ю.Н., Тайлаков Б.Б. и др. Внутриартериальная химиотерапия как составная часть комбинированного лечения саркомы Юинга длинных трубчатых костей // Вестник ОНЦ АМН России. – 1997. – № 2. – С. 24–8.
6. Трапезников Н.Н., Соловьев Ю.Н., Еремина Л.А. и др. Прогресс в лечении остеогенной саркомы // Вестник ОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 1993. – №1. – С. 3–9.
7. Трапезников Н.Н., Карапетян Р.М., Геворкян А.А., Бохан Б.Ю. Неадьювантный подход к лечению сарком мягких тканей конечностей // Вестник ОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 1998. – № 1. – С. 34–40.
8. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Кобляков В.А., Райхлин Н.Т. Новые модели для экспериментальной химиотерапии опухолей // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 701–6.
9. CBalser K., Rogatti W., Ruttgerodt K. Efficacy and Tolerability of Intra-arterial and Intra-venous Pros-taglandin EI Infusions in Occlusive Arterial Disease Stage III/IV. In: VASA. – 1989. – 28(Suppl.). – P. 31–8
10. Stephens F.O. Pharmacokinetics of intraarterial chemotherapy, vascular perfusion in cancer therapy / Edited by Schwemmler K., Aigner K. in: Recent Results in Cancer Research. 86: Springer Verlag, Berlin, 1983.
11. Treshalina H., Kobliakov V., Duzheva T. et al. Biochemical and Morphological Profiles of Cholangiocellular Carcinoma PC-1 after Subcutaneous and Intrahepatic Transplantation // Экспериментальная онкология. – 2001. – Т. 23, № 2. – С. 126–30.
12. <http://www.zabolevanija-pecheni.ru>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 541.64:546-022.53

Н.Ю. Анисимова¹, Ю.И. Должикова¹, В.А. Даванков², А.В. Пастухов², С.И. Миляева³,
Ф.С. Сенатов³, М.В. Киселевский¹

ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ НАНОСОРБЕНТОВ**НА ОСНОВЕ СВЕРХСШИТЫХ ПОЛИМЕРОВ СТИРОЛА СЕРИИ СТИРОСОРБ**

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

³Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

Контактная информация:

Анисимова Наталья Юрьевна, старший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел.+7(495)324-27-94

e-mail: n_anisimova@list.ru

Статья поступила 04.08.2011; подписана в печать 18.01.2012.

Резюме

Целью настоящего исследования являлась оценка гемосовместимости двух представителей полимерных сорбентов из серии Стиросорб (сверхсшитый полистирол Стиросорб 514 и магнитный сорбент MMN200 на основе аналогичного материала) в сравнении с гранулированным активированным углем (ГАУ), используемым в гемосорбции (Adsorba 300). Кроме того, охарактеризована структура сорбентов серии Стиросорб, подготовленных для гемосорбции (промывка этанолом, стерильной водой и физиологическим раствором хлорида натрия). Сканирующая электронная микроскопия показывает, что гранулы тестируемых полимерных сорбентов имеют гладкую поверхность с размером открытых пор не более 100 нм, а удельная площадь поверхности гранул Стиросорб 514 и MMN200 согласно результатам расчетов, выполненных по уравнению БЭТ, составила 806 м²/г и 580 м²/г соответственно.

Сорбентами набивали миниатюрные макеты колонок для гемоперфузии, через которые фильтровали кровь здоровых собак (всего 50 циклов фильтрации). Установлено, что интенсивность гемолиза эритроцитов при контакте с сорбентами серии Стиросорб на 74–80 % ниже в сравнении таковой под воздействием ГАУ. При этом оба испытуемых полимерных сорбента, Стиросорб 514 и MMN200, в сравнении с активированным углем вызывают меньшую агрегацию тромбоцитов крови собаки: MMN200 – в 1,6 раза, Стиросорб 514 – в 3,1 раза.

Количество неповрежденных лейкоцитов в крови здоровой собаки в результате многоэтапной гемоперфузии через макеты колонок с ГАУ и MMN200 достоверно снижалось в 4,6 раза и в 1,4 раза соответственно и не снижалось после контакта с Стиросорб 514. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что протестированные сверхсшитые полистирольные сорбенты Стиросорб 514 и MMN200 при гемоперфузии оказывают на клетки крови млекопитающих менее повреждающее действие, чем гранулированный активированный уголь, широко применяемый для гемосорбции.

Ключевые слова: сверхсшитые полистиролы, Стиросорб, гемосовместимость, сорбент

N.Yu. Anisimova¹, Yu.I. Dolzhikova¹, V.A. Davankov², A.V. Pastukhov², S.I. Miljaeva³,
F.S. Senatov³, M.V. Kiselevsky¹

HEMOCOMPATIBILITY OF NANOSTRUCTURED SORBENTS BASED**ON HYPERCROSSLINKED STYRENE POLYMERS OF THE STYROSORB SERIES**

¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

²A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow

³State Technology University «MISIS», Moscow

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the hemocompatibility of two representatives of the polymer sorbents of Styrosorb series (hypercrosslinked polystyrene Styrosorb 514 and magnetic material MMN200) in comparison with the granular activated carbon used in hemoperfusion (Adsorba 300). In addition, the Styrosorb sorbents structure was characterized after preparing them for hemosorption (washing with ethanol, sterile water and 0.9% NaCl). The scanning electron microscopy shows that the sorbents granules have a smooth surface with the size of the open pores less than 100 nm, while the BET specific surface area of Styrosorb 514 and MMN200 was 806 m²/g and 580 m²/g respectively.

The sorbents have been packed in miniature models of columns for hemoperfusion through which we filtered the blood of healthy dog (a total of 50 filtering cycles). It was found that the haemolysis rate of red blood cells in contact with Styrosorb series sorbents was 74-80% lower compared to that in contact with the carbon. MMN200 and Styrosorb 514, compared with the activated carbon, caused smaller aggregation of blood platelets (by a factor of 1.6 and 3.1 respectively).

As a result of a multi-stage hemoperfusion through columns with the carbon and MMN200, the number of intact leukocytes in the blood of healthy dogs dropped by a factor of 4.6 and 1.4 respectively. No decrease in leukocytes was observed after exposure to Styrosorb 514. Thus the results indicate that the tested hypercrosslinked polystyrene sorbents Styrosorb 514 and Styrosorb MMN200 exert less damaging effects on the blood cells of mammals than the granular activated carbon used for hemosorption.

Key words: hypercrosslinked polystyrene, Styrosorb, hemocompatibility, sorbent.

Введение

Длительное время в медицинской практике в качестве основы неселективных гемосорбентов широко применяется активированный уголь. Однако, несмотря на химическую модификацию поверхности, показатели биосовместимости этого вида материалов не являются оптимальными: при контакте гранул активированных углей с клетками крови отмечают гемолиз эритроцитов и активную агрегацию тромбоцитов [7]. Современные достижения в области разработки новых материалов с использованием нанотехнологий расширили спектр потенциально перспективных гемосорбентов. В частности сорбенты на основе сверхсшитых полимеров стирола серии Стиросорб [5], благодаря пористой структуре матрицы и поверхности гранул, способны элиминировать широкий спектр биологически активных молекул (бактериальный эндотоксин, цитокины, гормоны) [8; 9]. Эти сорбенты могут быть также использованы в качестве полимерной матрицы для получения наногибридных композиционных материалов, обладающих особым комплексом свойств. В частности значительный интерес представляют новые полимернеорганические наноконкомпозиты – магнитные сорбенты, полученные методом химического осаждения оксидов железа в порах сверхсшитых полистирольных сорбентов [4]. Вообще нанодисперсный магнетит (Fe_3O_4) сам находит применение в медицине. Суммарная площадь сорбционной поверхности магнетита составляет от 800 до 1200 $\text{м}^2/\text{г}$, а напряженность магнитного поля, которое индуцируется каждой частицей, достигает 300–400 кА/м [2]. Однако низкая гемосовместимость этого материала лимитирует его внедрение в клиническую медицинскую практику, предполагающую контакт с клетками [12]. Эти проблемы в значительной степени можно разрешить созданием наноконкомпозитных материалов, где полимерная гемосовместимая матрица экранирует поверхность неорганического компонента.

Целью настоящего исследования являлась оценка гемосовместимости и характеристика пористой структуры двух представителей полимерных сорбентов из серии Стиросорб (сверхсшитый полистирол Стиросорб 514 и магнитный материал на его основе MMN200) в сравнении с углеродным гемосорбентом.

Материалы и методы

Тестируемые сорбенты. Образцы сверхсшитого полистирола Стиросорб 514, имеющего формальную степень сшивки порядка 200 % и не содержащего функциональных групп, и магнитного сорбента MMN200 были получены в лаборатории стереохимии сорбционных процессов ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН. Оба сорбента представляли собой сферические гранулы диаметром 0,3–1,0 мм с развитой внутренней структурой. Сорбенты промывали этанолом, стерильной водой и физиологическим раствором хлорида натрия. В качестве контроля использовали ГАУ, являющийся основой гемосорбционной колонки Adsorba 300 (Gambro Co., Sweden).

Дизайн исследования. Подготовленными сорбентами ($m=1,3\pm 0,1$ г) набивали миниатюрные макеты колонок для гемоперфузии, через которые фильтровали кровь здоровой собаки объемом 10 мл со скоростью порядка 1,3 мл/мин. Фильтрацию этой порции крови повторяли многократно, всего было сделано 50 циклов фильтрации.

Пробы для исследования динамики агрегации тромбоцитов и гемолиза отбирали через каждые 5 циклов фильтрации, осуществив, таким образом, 10 этапов рециркуляции. Измерение всех параметров проводили в трех параллельных пробах.

Интенсивность гемолиза (ИГ) эритроцитов рассчитывали по формуле:

$$\text{ИГ}(\%) = \left(\frac{\text{ОПГС}}{\text{ОПинтакт.}} - 1 \right) \times 100$$

Для этого определяли оптическую плотность плазмы крови после гемосорбции (ОПГС) и интактной крови (ОПинтакт) при $\lambda=540\text{нм}$ на спектрофотометре MS Multiscan, Fiënländ.

Агрегация тромбоцитов. Этот показатель оценивали по результатам световой микроскопии, определяя процент тромбоцитов крови, включенных в агрегаты после каждого этапа рециркуляции [3]. Интенсивность агрегации тромбоцитов рассчитывали как разницу количества тромбоцитов в агрегатах в крови после перфузии через колонки и базового уровня тромбоцитов в интактной пробе.

Оценка цитопатогенного воздействия на лейкоциты крови. Рассчитывали количество живых клеток в крови после завершения всех 50 циклов гемосорбции в камере Горяева по исключению красителя трипанового синего (ПанЭко, РФ). Для этого эритроциты лизировали с помощью OptiLyse (Immunotech, France) при соотношении крови и реактива 1 : 5.

Статистический анализ. Осуществляли с использованием непараметрических критериев, определяя медиану и размах данных. Сравнение показателей групп проводили, используя U-критерий Манна–Уитни. Достоверными считали различия показателей при $p < 0,05$.

Характеристика пористой структуры сорбентов. Исследование поверхности и сколов гранул проводили на сканирующем электронном микроскопе Hitachi TM-1000 (ускоряющее напряжение 15 кВ, увеличение $\times 10\,000$). Измерение удельной площади поверхности проводили методом низкотемпературной адсорбции азота БЭТ на установке Quantachrome NOVA 1200e.

Результаты и обсуждение

Гемолиз эритроцитов в фильтруемой через гемосорбенты крови нарастает прямо пропорционально числу этапов рециркуляции крови, т.е. длительности контактов с сорбентами (рис.1). Однако полученные данные свидетельствуют о том, что интенсивность гемолиза эритроцитов при контакте с сорбентами серии Стиросорб на 74–80 % ниже в сравнении с воздействием ГАУ. При этом оба испытываемых полимерных сорбента, Стиросорб 514 и MMN200 оказывали схожий по величине эффект.

На рис. 2 приведены результаты оценки агрегации тромбоцитов при перфузии крови через сорбенты ряда Стиросорб и активированный уголь. Эти данные свидетельствуют о том, что вследствие контакта с ГАУ агрегация тромбоцитов крови значительно возрастает. Уже по окончании первого этапа рециркуляции агрегатообразование было на 18 % выше ($p=0,025$), чем в интактной крови, а после четвертого этапа агрегатообразование достигло 31 % ($p=0,004$). Падение концентрации тромбоцитов при фильтрации крови через колонки на основе сорбентов ряда Стиросорб было менее существенным, а после 2 этапов рециркуляции дальнейшая агрегация практически не отмечалась.

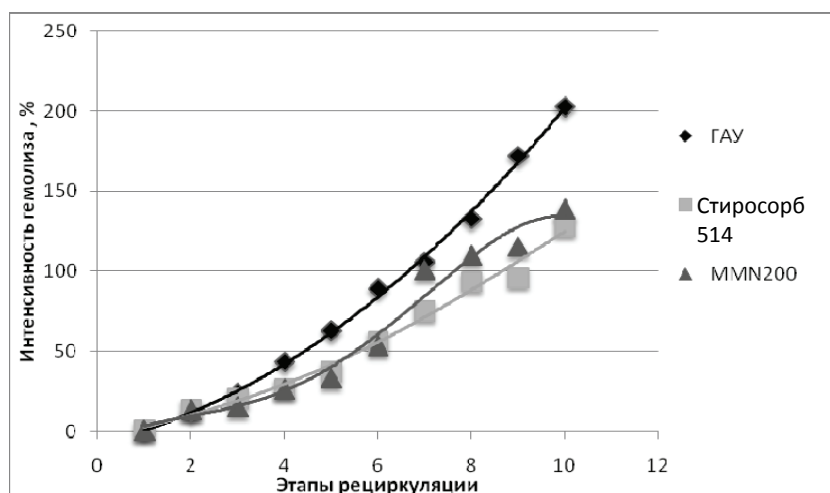


Рис. 1. Интенсивность гемолиза эритроцитов при перфузии через колонки с Стиросорб 514, MMN200 и ГАУ.

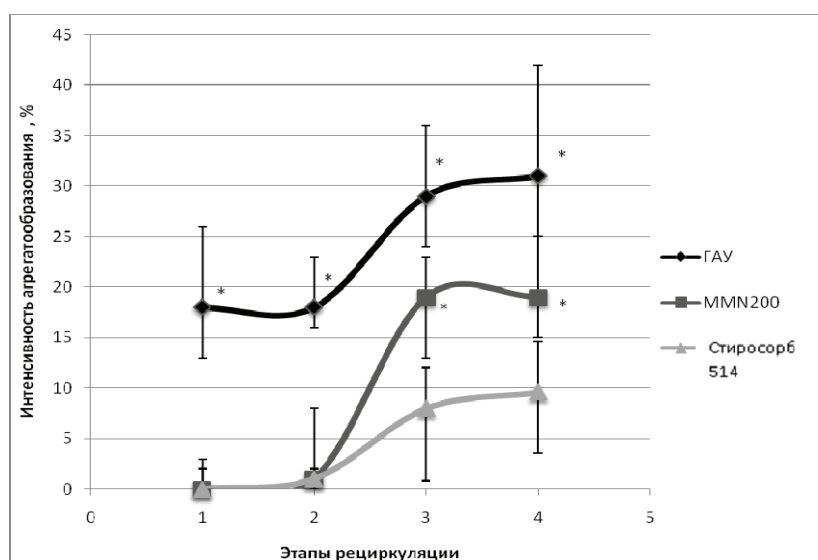


Рис. 2. Интенсивность агрегации тромбоцитов при перфузии через колонки с Стиросорб 514, MMN200 и ГАУ; (* $p > 0,05$).

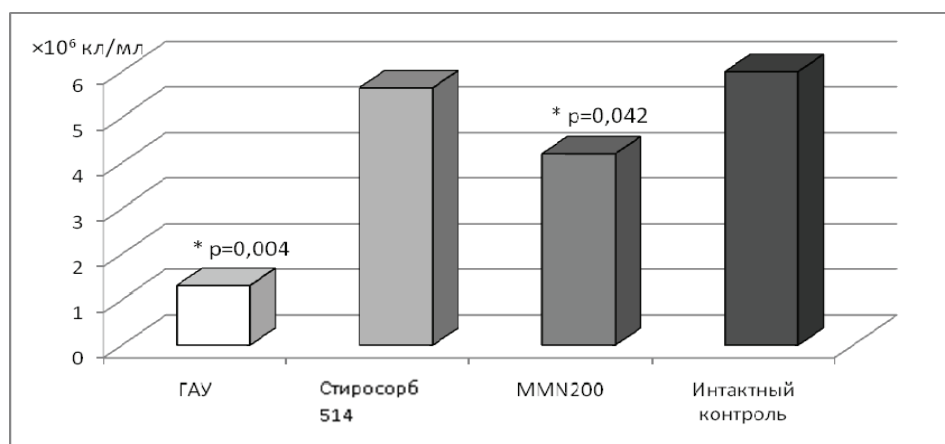


Рис. 3. Концентрация лейкоцитов крови собаки в результате перфузии через колонки с ГАУ, Стиросорб 514 и MMN200 в сравнении с исходной концентрацией в интактной пробе (* $p < 0,05$).

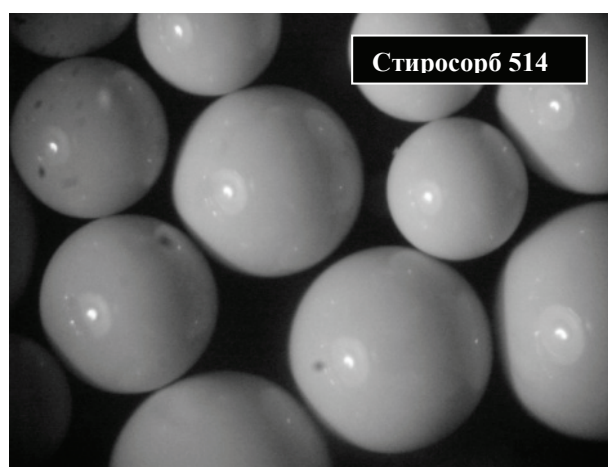
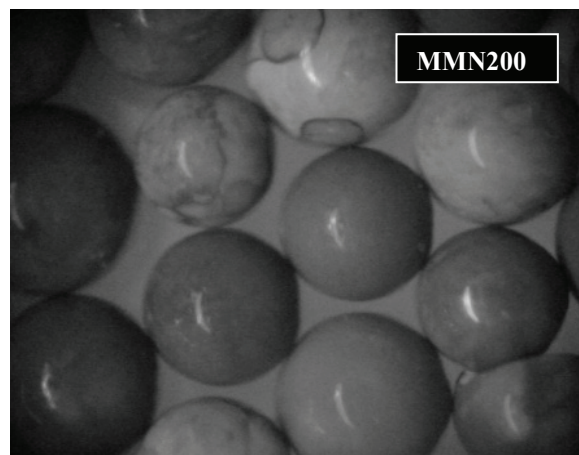


Рис. 4. Внешний вид исследуемых сорбентов. Оптическая микроскопия, $\times 40$.

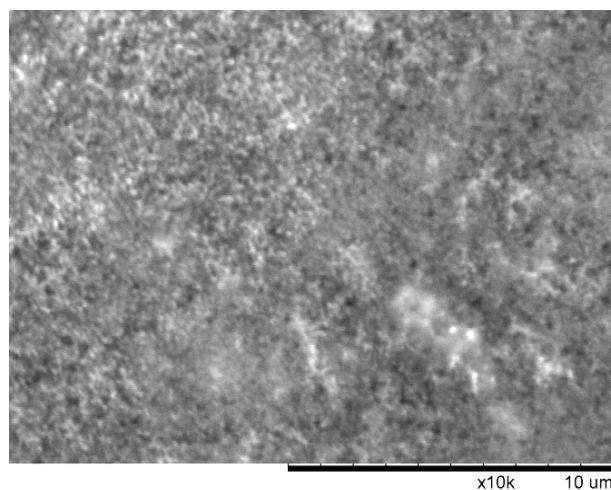
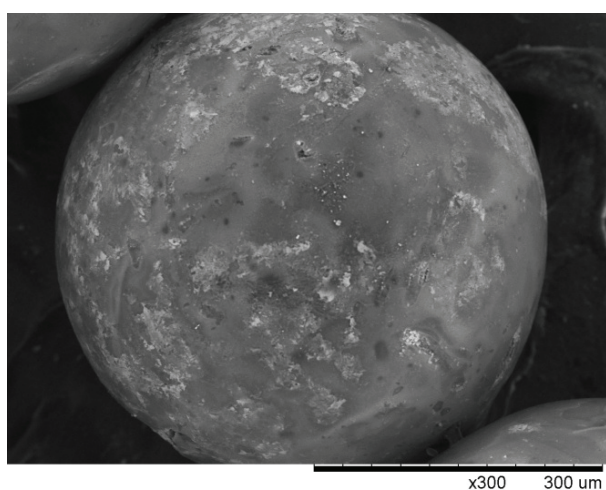


Рис. 5. Поверхность гранул сорбента Стиросорб MMN200. Сканирующая электронная микроскопия.

В итоге 4-кратной рециркуляции крови через эти колонки наблюдалась умеренная агрегация тромбоцитов в сравнении с исходным уровнем: 18 % после контакта с MMN200 ($p=0,022$) и всего 10 % после контакта с Стиросорб 514 ($p=0,094$). Таким образом, тестируемые полимерные сорбенты в сравнении с активированным углем вызывают меньшую активацию тромбоцитов крови собаки: MMN200 – в 1,6 раза, Стиросорб 514 – в 3,1 раза.

Проведенные нами исследования позволили установить, что в результате многоэтапной гемоперфузии через макеты колонок с ГАУ и MMN200 количество живых лейкоцитов в крови здоровой собаки достоверно снижалось в 4,6 раза и в 1,4 раза соответственно. В то же время, многоэтапная перфузия крови через колонку с Стиросорб 514 не приводила к однозначно детектируемому повреждению лейкоцитов (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что протестированные сверхсшитые полистирольные сорбенты Стиросорб 514 и Стиросорб MMN200 при гемоперфузии оказывают на эритроциты и лейкоциты млекопитающих менее повреждающее действие, чем гранулированный активированный уголь, широко применяемый для гемосорбции. Как известно, гемосовместимость определяется не только материалом, из которого состоит сорбент, но и размером его гранул, а также структурой его поверхности. При этом мелкие гранулы с большей площадью поверхности способны более эффективно элиминировать биологически активные вещества, чем более крупные частицы. Однако из-за малых размеров каналов между мелкими частицами форменные элементы крови подвергаются в потоке гораздо более высоким напряжениям сдвига, что приводит, в частности, к гемолизу эритроцитов [6]. По этой причине в большинстве гемосорбционных устройств применяют гранулы диаметром более 100 мкм или фильтр для предварительного отделения плазмы от форменных элементов [10]. Это предопределило выбор для гемосорбции гранул размером 0,3–1,0 мм (рис. 4), причем сферическая форма полимерных частиц более предпочтительна. Оптическая микроскопия выявляет также еще одно важное преимущество полимерных гранул, очевидно связанное с их высокой механической прочностью: материал не содержит пылевидных фракций, тогда как активированный уголь не свободен от мелких крошек, способных вызывать эмболию капилляров. Как отмечалось выше, особенности поверхности сорбентов также значительно влияют на состояние клеток фильтруемой крови.

Литература

1. Анисимова Н. Ю., Даванков В. А., Корнюшенков Е. А. и др. Эффективность применения сверхсшитых полистиролов для экстракорпоральной детоксикации при сепсисе // Рос. Вет. Ж. Мелкие домашние и дикие животные. – 2011. – №2. – С. 23–5.
2. Белоусов А.Н. Научно-практический опыт применения наночастиц магнетита в медицине // Вестник Национального технического университета «ХПИ». – 2010. – Т. 47. – С. 9–16.
3. Медицинские лабораторные технологии. Справочник под ред. А.И. Карпищенко. – Т. 1. – СПб.: Интермедика, 2002. – 408 с.
4. Пастухов А.В., Даванков В. А., Волков В.В. и др. Магнитные наноконкомпозиты на основе сверхсшитых полистиролов // Известия РАН. Серия физическая – 2009. – Т. 73, № 4. – С. 496–8.
5. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Меркулова Ю.Д. и др. Образование супрамолекулярных комплексов в процессах сорбционного выделения аминазина из биологических жидкостей // Мат. Всерос. конф. с элементами научной школы для молодежи, Белгород, 14–17 сент. 2010 г. – Белгород, 2010. – С. 159–62.
6. Brandl M., Hartmann J. et al. Detection of fluorescently labeled microparticles in blood//Blood Purif. – 2005. – 23(3). – P. 181–9.
7. Mikhalovsky S.V. Emerging technologies in extracorporeal treatment: focus on adsorption // Perfusion. – 2003. – 18(1). – P. 47–54.
8. Murphy M.C., Patel S., Phillips G.J. et al. Adsorption of inflammatory cytokines and endotoxin by mesoporous polymers and activated carbons // Studies in Surface Science and Catalysis. – 2002. – 144. – P. 515–20.
9. Saha B., Karounou E., Sreea M. Removal of 17 β -oestradiol and 17 α -ethinyl oestradiol from water by activated carbons and hypercrosslinked polymeric phases // Reactive and Functional Polymers. – 2010. – 70(8). – P. 531–44.
10. Valenti I.E. Characterization of a novel sorbent polymer for the treatment of sepsis. B.S. in Bioengineering – The Pennsylvania State University, 2010. – 117 p.
11. Winchester J.F., Ronco C., Salsberg J. et al. Sorbent augmented...//Contributions to nephrology. – 2002. – 137. – P. 170–80.
12. Zhao H., Saatchi K., Häfel U.O. Preparation of biodegradable magnetic microspheres with poly(lactic acid)-coated magnetite // J Magnetism Magnetic Materials. – 2009. – 321(10). – P. 1356–63.

Сканирующая электронная микроскопия показывает, что гранулы тестируемых полимерных сорбентов имеют гладкую поверхность с размером открытых пор не более 100 нм (рис. 5).

Согласно полученным ранее данным [4] Стиросорб 514 является бипористым полимером с большим числом микропор диаметром 1,5–3 нм и макропорами вплоть до 100 нм, что дает средний (по объему пор) радиус пор 36 ± 7 нм. В сорбенте MMN200 имеются наночастицы магнетита со средним радиусом $6,7\pm 3,8$ нм [4]. Можно предположить, что наличие в структуре полимерной матрицы этих наночастиц магнетита (Fe, мас. % –8,7–8,9% [4]) в сочетании с их намагнитченностью обусловило некоторое ухудшение его биосовместимости, что проявилось в усилении агрегации тромбоцитов и снижении количества живых лейкоцитов в крови после гемоперфузии. Наличие большого числа открытых пор во всех сорбентах ряда Стиросорб подтверждается измерениями внутренней удельной поверхности гранул методом низкотемпературной сорбции азота. Согласно результатам расчетов, выполненных по уравнению БЭТ, удельная площадь поверхности гранул Стиросорб 514 и MMN200 составляет $806\text{ м}^2/\text{г}$ и $580\text{ м}^2/\text{г}$ соответственно. Эти данные несколько отличаются от приведенных в литературе характеристик этих сорбентов (Стиросорб 514– $1100\text{ м}^2/\text{г}$; MMN200 – $1200\text{ м}^2/\text{г}$ [4]), вероятно, вследствие того, что часть объема гранул оказалась заполненной кристаллами хлорида натрия, т.к. промывание физиологическим раствором являлось этапом подготовки сорбентов для гемоперфузии.

Заключение

Сверхсшитые полистиролы Стиросорб 514 и Стиросорб MMN200 являются сорбентами с большой сорбционной емкостью, имеющими сильно развитую внутреннюю поверхность и открытую пористость с размером пор менее 100 нм. Эти материалы значительно превосходят гранулированный активированный уголь по таким показателям гемосовместимости как интенсивность лизиса эритроцитов, агрегации тромбоцитов и уменьшение концентрации живых лейкоцитов. Этот факт наряду с установленной ранее способностью эффективно элиминировать из кровотока различные токсины [8] – как бактериальные, так и широкий спектр про- и противовоспалительных факторов [1; 11], позволяет рассматривать эти материалы как перспективные для применения в качестве гемосорбентов в медицинской и ветеринарной практике.

Приносим свои извинения за ошибку, допущенную в номере 4/2011.

Статья:

Н.Г. Кормош
**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ
АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА
(СУБКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ) – ВЗГЛЯД КЛИНИЦИСТА**

На странице 29, абзацы 1-4 следует читать:

Около 2,5 миллиардов лет назад эволюционное развитие цианобактерий, способных к фотосинтезу, по общепринятой версии привело к радикальным изменениям в составе атмосферы нашей планеты. Увеличение концентрации кислорода в среде обитания потребовало от всех живых организмов эволюционной перестройки для использования этого нового ресурса. Развитие эукариот шло по пути энергоэффективности и использования кислорода для генерирования энергии. Включение митохондрий в клетки дало 18-кратное энергетическое преимущество эукариотам: при анаэробном расщеплении одной молекулы глюкозы суммарный выход АТФ составляет 2 молекулы, а при аэробном – 36. Обратной стороной преимущества аэробной жизни стали АФК, опасные для многих жизненно важных молекул.

Молекула кислорода содержит два неспаренных электрона с параллельно ориентированными спинами. Эти электроны находятся на разных орбиталях, поскольку два электрона могут занимать одну орбиталь, если их спины противоположны. Такая особенность строения молекулы кислорода позволяет ей, с одной стороны, быть бирадикалом, с другой – сохранять стабильное триплетное состояние. В соответствии с законами квантовой механики восстановление кислорода одномоментно двумя электронами возможно только бирадикалами, а одноэлектронно – радикалами, при этом скорость реакции практически не зависит от природы окисляемого субстрата и определяется диффузией. Взаимодействие кислорода с веществами нерадикальной природы невозможно без «обращения» спина одного из двух электронов. Такая реакция требует энергии, а молекула кислорода переходит в синглетное состояние. Спиновой запрет восстановления может быть преодолен последовательным добавлением одиночных электронов – одноэлектронным восстановлением кислорода. Следовательно, в таких реакциях с кислородом образуются промежуточные продукты – супероксид, перекись водорода и гидроксидный радикал. Эти кислородные метаболиты чрезвычайно активны: реакции с их участием идут с большой скоростью и высвобождением энергии. Учитывая общность течения реакций, они объединены в одну группу АФК.

УДК 616.25-002:616-006-092.9:615.03

*Д.В. Филоненко, Н.В. Андропова, Е.М. Трещалина, Г.К. Герасимова***ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ БИНАРНЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФТАЛОЦИАНИНОВ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ВНУТРИПЛЕВРАЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПЛЕВРИТОВ***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН», Москва***Контактная информация***Филоненко Дмитрий Владимирович, аспирант отделения химиотерапии***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(499)324-14-09**e-mail:** filonenkodima@mail.ru

Статья поступила 06.08.2011, подписана в печать 18.01.2012.

Резюме

В работе описана эффективность и токсичность бинарных каталитических систем с терафталом, оксикобаламином или эфитером в качестве катализаторов и аскорбиновой кислотой в качестве восстановителя при внутриплевральном (в/пл) введении мышам с в/пл трансплантированными опухолями. Показано, что с учетом показателей эффективности лечения опухолевого плеврита, индукции плевродеза и «острой» токсичности перспективными для клинического изучения являются Ок+АК и ТФ+АК. Пара ТФ+АК, эффективно индуцирующая плевродез, показала лучшие терапевтические характеристики при молярном соотношении компонентов 1 : 100, терапевтический индекс ТИ >1,5. Эф+АК в использованных дозировках недостаточно эффективна.

Ключевые слова: мыши, модель опухолевого плеврита, бинарная каталитическая система, эффективность, плевродез.

*D.V. Filonenko, N.V. Andronova, H.M. Treshalina, G.K. Gerassimova***THE VALUE OF BINARY CATALYTIC SYSTEM WITH PHTHALOCYANINES AND ASCORBIC ACID FOR INTRAPLEURAL TREATMENT OF MALIGNANT PLEURAL EFFUSION***FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

In work the efficacy and tolerance of the binary catalytic systems with teraftal, oxycobalamin or ephyther as the catalyzators with ascorbic acid as the reducer by the intrapleural administration to mice with i.p. transplanted tumors is described. It was shown through efficacy of malignant pleurisy treatment, pleurodesis inducing and «acute» toxicity that the most perspective for clinical investigation are Oc+AA and Tph+AA.

Tph+AA with molar parity of components as 1:100 demonstrates the best therapeutically data with high pleurodesis inducing, terapeutical index TI>1,5. Eph+AA with the used dosage do not demonstrate enough efficacy.

Key words: mice, experimental malignant pleurisy, binary catalytic system, efficacy, pleurodesis.

Введение

Ранее в эксперименте бинарная каталитическая система ТФ+АК с молярным соотношением компонентов 1 : 10 М/мл и дозовым соотношением 1 : 2,2 мг/кг была охарактеризована как хорошо переносимая и высокоэффективная при внутриплевральной терапии экспериментальных опухолевых плевритов и индукции плевродеза на мышах [2; 7; 9; 12; 13]. Эти исследования были основанием для начала клинического изучения по 1 фазе ТФ+АК (молярное соотношение 1 : 10) при внутриплевральном введении больным с ОП. При проведении 1 фазы клинического изучения параллельно управляемой лимитирующей токсичности (болевая реакция) при применении БКС у пациентов с ОП был получен объективный противоопухолевый эффект в 80 % случаев в виде частичных ремиссий (осумкование выпота). Указанный эффект каталитической пары адекватен известным средствам лечения ОП в клинике [15–18; 20]. Учитывая результаты исследований *in vitro*, показавших преимущество при увеличенном молярном соотношении ТФ : АК=1 : 100, в настоящем исследовании нами проведено исследование *in vivo* при использовании адекватно увеличенных доз на модели ОП и плев-

родеза. Исследования направлены на повышение эффективности лечения. Кроме того, для изучения перспективы применения других катализаторов окисления АК и создания нескольких терапевтических систем лечения больных с ОП, в исследование включены 2 других катализатора – оксикобаламин [8; 10; 22–24] и кобальт.

Материалы и методы**Препараты**

Аптечный препарат аскорбат натрия (АК) 5 % в ампулах по 1,0 мл (РФ) вводили мышам однократно внутриплевралью (в/пл) в дозах от 138 до 1100 мг/кг первой, до катализаторов. Терафтал-лио (ТФ) сер. 020406 получен от Н.А. Оборотовой (лаб. разработок ЛФ НИИ ЭДнТО) во флаконах по 50 мг. Вводили мышам 0,1%-ный раствор в физиологическом растворе хлористого натрия однократно в/пл в дозе 25 мг/кг для обеспечения лучшей переносимости лечения, учитывая потенциальное повышение токсичности при сочетании с большими дозами АК. Оксикобаламин и эфитер для парентерального введения в виде лиофилизированных лекарственных форм во флаконах получены из НИОПИК в достаточном количестве с паспортами.

Мышам вводили Ок в 1%-ной концентрации, Эф – в 5%-ной концентрации в физиологическом растворе. Катализаторы вводили в/пл однократно сразу после АК. Проведено 3 опыта с использованием ТФ+АК в соотношениях 1 : 25–1 : 50–1 : 100 соответственно, [25+138]–[25+275]–[25+550] мг/кг. Ок+АК изучен в дозировках [100+125]–[100+250]–[200+250] мг/кг, Эф+АК – в дозировке [750+268] мг/кг.

Опухолевая модель и животные

Для изучения эффективности воздействия в отношении опухолевых плевритов использованы описанная модель ОП на мышах [1; 3; 4; 13; 14; 21]. Для исследований использованы 2–4 пассажи в/б трансплантированной карциномы Эрлиха (подштамм ELD) из Банка опухолевых штаммов РОНЦ, доноры – мыши-самки BDF₁. Опухоль трансплантировали в/пл по стандартной методике, принятой в РОНЦ, лечение начинали через 48 ч. Проведено 2 опыта на 80 мышах-гибридах BDF₁♂ из разведения РОНЦ, которых содержали в виварии на брикетированных кормах. Для выполнения экспериментов животных ранжировали на 4 группы, по 5–6 особей в каждой. Одну из групп оставляли без лечения и считали контрольной.

Модель плевродеза и животные

Для исследований использована описанная модель плевродеза [1; 5; 6; 13; 14; 16] на здоровых мышах-самках BDF₁. Всего использовано 70 особей. Мышей содержали в виварии РОНЦ. Препараты описаны выше. Введение препаратов выполняли внутриплеврально однократно в диапазоне доз с увеличенным соотношением с аскорбиновой кислотой соответственно экспериментам на моделях ОП. Для выполнения эксперимента животных распределяли по группам по 6–10 особей в каждой. В качестве контрольного плевросклерозирующего средства использован 3 %-ный раствор тетрациклина. О противоопухолевой активности судили по увеличению продолжительности жизни леченых мышей по сравнению с группами контроля (УПЖ, %; Т/С%). Статистическая обработка данных выполнена с использованием стандартного метода Фишера в модификации Р.Б. Стрелкова и расчетом доверительных интервалов средних сравниваемых величин. О переносимости терапии судили по поведению и состоянию мышей после введения или гибели в течение всего опыта. Наблюдение за мышами продолжали до гибели.

Оценка плевросклерозирующего эффекта

Выполнена по 5-бальной шкале [1; 10–12; 19]. Наблюдение за мышами продолжали в течение 2–3 недель (период формирования спаек).

Оценка терапевтического индекса каталитической системы

при внутриплевральном введении мышам

Для расчета ТИ каталитических систем, эффективных при ОП, проведено определение величины среднесмертельной дозы ТФ и Ок в эффективных сочетаниях с АК при в/пл введении здоровым мышам. Использовано 50 здоровых мышей-самок BDF₁, которых содержали в виварии РОНЦ. Для выполнения экспериментов животных распределяли по группам по 6–10 особей в каждой. Препараты описаны выше. Введение препаратов выполняли в/пл однократно. Для оценки «острой» токсичности эффективного сочетания ТФ+АК с молярным соотношением 1 : 100 ТФ вводили в фиксированной дозе 25 мг/кг, а АК вводили в раз-

личных увеличенных соотношениях к ТФ. Соотношение ТФ+АК составило: 1 : 150; 1 : 175; 1 : 225; 1 : 250; 1 : 300. Дозы ТФ+АК составили соответственно: 25+825 мг/кг; 25+962 мг/кг; 25+1238 мг/кг; 25+1375 мг/кг и 25+1650 мг/кг. Отдельно оценили токсичность АК в максимальной дозе, использованной в каталитической паре при достижении адекватного объема вводимого в плевральную полость за счет физиологического раствора. Оценка токсичности выполнена после гибели мышей. Наблюдение за мышами продолжали в течение 2–3 недель. Расчет величин токсических доз выполнен по стандартному методу Литчфилда–Уилкоксона.

Результаты

Эффективность

каталитических систем на моделях ОП

В первой серии экспериментов показано (табл. 1), что при сочетании ТФ+АК в соотношении 1 : 25 противоопухолевый эффект минимальный, УПЖ=12 %. Увеличение соотношения до 1 : 50 привело к повышению эффективности в 7,5 раз, т.е. УПЖ=91 %. Дальнейшее увеличение соотношения до 1 : 100 привело к получению достоверного УПЖ=155 % ($p<0,05$), которое было в 1,7 раза больше предыдущего результата. Таким образом, при двукратном увеличении соотношения доз ТФ+АК получено многократное увеличение эффективности, достигшее достоверной значимости при оптимальном соотношении ТФ+АК=1 : 100. Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели от токсичности не отмечали. При сочетании Ок+АК в дозах 100+125 противоопухолевый эффект достоверный и значимый, УПЖ=94% ($p<0,05$). При сочетании Эф+АК в дозах 750+268 мг/кг противоопухолевый эффект практически отсутствует, УПЖ=3. Переносимость лечения в обеих парах была удовлетворительной, гибели от токсичности не отмечали. Таким образом, увеличение соотношения агентов в паре ТФ+АК приводит к увеличению эффективности лечения, оптимальной было соотношение 1 : 100 при дозах 25+550 мг/кг.

При использовании Ок в фиксированном соотношении с АК получены сравнимые с ТФ+АК результаты по эффективности. Эф в фиксированном дозовом соотношении с АК был практически неэффективен. Для второго опыта были отобраны эффективные сочетания препаратов с целью воспроизведения и развития эффекта.

Для сочетания ТФ+АК были использованы большие соотношения доз, вплоть до 1 : 200, кратность соотношения доз была 1 : 10.

Во второй серии экспериментов оценена воспроизводимость полученных эффектов. Показано (табл. 2), что при сочетании ТФ+АК в соотношении 1 : 10 противоопухолевый эффект минимальный, УПЖ=13 %. Увеличение соотношения до 1 : 100 привело к повышению эффективности в 6,8 раза, т.е. УПЖ=88 %. Дальнейшее увеличение соотношения до 1 : 200 привело к отрицательному результату: у всех мышей развился серозный плеврит как следствие токсического действия биологически активного начала каталитической системы на плевру. В результате серозного плеврита мыши пали на 5–6 сутки.

Резкое ухудшение переносимости ТФ+АК при увеличении дозы АК до 1100 мг/кг расценено как следствие передозировки восстановителя и чрезмерной цитотоксической реакции в плевральной полости.

Таблица 1

Эффективность различных катализаторов окисления аскорбиновой кислоты в сочетаниях с АК на модели опухового плеврита ELD (опыт 1)

Группа (n=5)	Сочетание с АК	Доза	СПЖ*, дни	УПЖ, %
Контроль	Физ. раствор	0,4 мл	6,6±1,1 [5,5÷7,7]	–
ТФ+АК	1 : 25	25+138 мг/кг	7,4±2,75 [4,65÷10,15]	12
ТФ+АК	1 : 50	25+275 мг/кг	11,8±6,6 [5,2÷18,4]	91
ТФ+АК	1 : 100	25+550 мг/кг	16,8±6,6 [10,2÷23,4]	155*
Эфитер+АК	–	750+268 мг/кг	6,8±1,65 [5,15÷8,45]	3
Оксикобаламин+АК	–	100+125 мг/кг	11,8±2,2 [9,6÷14]	94*

*средняя арифметическая с 95 %-ным ДИ

Таблица 2

Эффективность различных катализаторов окисления аскорбиновой кислоты в сочетаниях с АК на модели опухового плеврита ELD (опыт 2)

Группа	Сочетание с АК	Доза	СПЖ*, дни	Т/С, %
Контроль (n=6)	Физ. раствор	0,4 мл	6,0±1,3 [4,7÷7,3]	100
ТФ+АК (n=5)	1 : 10	25+55 мг/кг	6,8±3,9 [2,9÷10,7]	113
ТФ+АК (n=6)	1 : 100	25+550 мг/кг	11,2±6,9 [4,3÷18,1]	188
ТФ+АК (n=5)	1 : 200	25+1100 мг/кг	5,4 серозный плеврит	90

*средняя арифметическая с 95 %-ным ДИ

Таблица 3

Эффективность различных катализаторов окисления аскорбиновой кислоты в сочетаниях с АК на модели опухового плеврита ELD

Группа	Доза	СПЖ*, дни	УПЖ, %
Контроль (n=6)	0,4 мл	6,0±1,3 [4,7÷7,3]	–
Оксикобаламин+АК (n=5)	100+125 мг/кг	12,4±7,2 [5,3÷19,6]	107
Оксикобаламин+АК (n=6)	100+250 мг/кг	16,0±6,9 [9,1÷22,9]	168*
Оксикобаламин+АК (n=5)	200+250 мг/кг	16,8±5,5 [11,3÷22,3]	180*

*средняя арифметическая с 95 %-ным ДИ

Таблица 4

Эффективность плевросклерозирующего действия (плевродез) каталитической системой – ТФ в увеличенных соотношениях с АК

Дозы ТФ+АК	Молярное соотношение	Эффективность плевродеза, баллы (0-5)
25+55 мг/кг	1 : 10	0
25+275 мг/кг	1 : 50	3
25+550 мг/кг	1 : 100	5
*75+165 мг/кг	1 : 10	5

*Исторический контроль [2; 7]

Таблица 5

Величины расчетных токсических доз ТФ+АК в соотношениях от 1 : 150 до 1 : 300

Токсическая доза	Величина (мг/кг) с 95 %-ным ДИ
ЛД ₅₀	1463 [1237 ÷ 1688] мг/кг
МПД (ЛД ₁₀)	1002 [910 ÷ 1102] мг/кг
ЛД ₁₆	1103 мг/кг
ЛД ₈₄	1822 мг/кг
ЛД ₁₀₀	2002 мг/кг

Таблица 6

Терапевтический индекс каталитической пары при фиксированной дозе ТФ и увеличенной дозе АК

ТФ+АК (1 : 100)	1,82
ТФ+АК (1 : 10)	1,26
Тетрацилин	1,24

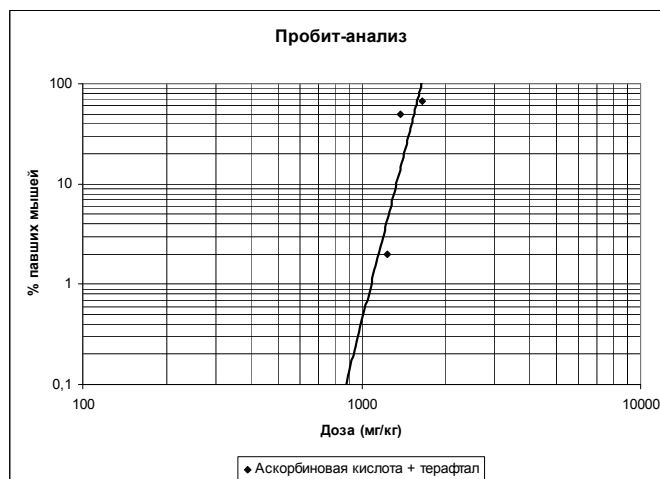


Рис. Пробит-анализ зависимости падежа мышей от дозы аскорбиновой кислоты и терафталла.

При применении Ок+АК в дозах 100+125 мг/кг противоопухолевый эффект высокий, УПЖ=107 % (табл. 3). Увеличение доз до 100+250 мг/кг привело к дальнейшему, в 1,6 раза, достоверному УПЖ=168 % ($p<0,05$). Изменение обеих доз до 200+250 мг/кг было максимально эффективным и привело к достоверному УПЖ=180 % ($p<0,05$). Переносимость всех видов лечения была удовлетворительной, гибели от токсичности не было. При использовании каталитической пары Ок+АК в дозах от 100+125 до 200+250 получен высокий достоверный противоопухолевый эффект, близкий по уровню к эффекту каталитической системы ТФ+АК при соотношении 1 : 100, т.е. в дозах 25+550 мг/кг.

Таким образом, эффективность каталитической системы ТФ+АК в отношении ОП/ELD проявляется увеличением выживаемости животных до 155 % в зависимости от величины примененных доз компонентов системы и возрастающей при увеличении молярного соотношения до 1 : 100. Каталитическая система Ок+АК в дозах (100–200)+(125–250) мг/кг проявляет высокий противоопухолевый эффект с увеличением продолжительности жизни мышей до 180 %, т.е. практически на уровне эффекта ТФ+АК при соотношении 1:100. Переносимость обеих систем удовлетворительная. Каталитическая система Эф+АК не влияет на ОП у мышей. Полученные данные послужили основанием для изучения одной из эффективных каталитических пар на способность индуцировать плевродез.

Индукция плевродеза с использованием каталитической системы ТФ+АК

При в/пл введении ТФ+АК в дозах 25+55 мг/кг (молярное соотношение 1 : 10) (табл. 4) плевродеза не получено, «0 баллов». При дозах 25+275 мг/кг (молярное соотношение 1:50) получено склерозирование плевральной полости на «3 балла». При дозах 25+550 мг/кг (молярное соотношение 1 : 100) получен плевродез, склерозирование «5 баллов». Переносимость схемы при всех соотношениях была удовлетворительной, характерных для болевого плевропульмонального шока явлений не наблюдали, гибели мышей от токсичности не отмечали. При применении схемы с соотношением компонентов 1 : 100 у мышей в течение суток наблюдали увеличение дыхательных экскурсий грудной клетки и уменьшение подвижности.

При в/пл введении мышам ТФ+АК в дозах 25+550 мг/кг (молярное соотношение 1 : 100) получен плевродез при удовлетворительной переносимости воздействия с явлениями умеренной кратковременной локальной болезненности. Сравнение полученных результатов с данными при дозах 75+165 мг/кг (молярное соотношение 1 : 10) показало идентичность плевросклерозирующего действия. Таким образом, использование каталитической системы ТФ+АК в увеличенном соотношении с аскорбиновой кислотой дает преимущество в виде существенного 3-кратного уменьшения дозы ТФ для достижения лечебного эффекта.

Оценка терапевтического индекса каталитических систем при в/пл введении

Исследования показали, что при в/пл введении мышам ТФ+АК при фиксированной дозе ТФ 25 мг/кг и АК в дозах 825 или 962 мг/кг (молярные соотношения 1 : 150 и 1 : 175) гибели в группах из 6 мышей каждая не зарегистрировано. При фиксированной дозе ТФ 25 мг/кг и АК в дозе 1238 мг/кг (молярное соотношение 1 : 225) пали 2 из 20 мышей, при дозе 1375 мг/кг (молярное соотношение 1 : 250) пали 3 из 6 мышей, а при дозе 1650 мг/кг (молярное соотношение 1 : 250) пали 4 из 6 мышей. Расчет токсических доз, выполненных по результатам опыта, показал (рис. и табл. 5), что для ТФ+АК с фиксированной дозой ТФ и увеличенной дозой АК величина среднесмертельной дозы составляет 25+1463 мг/кг. В данной паре максимально переносимыми дозами являются 25+1002 мг/кг, что по сравнению с эффективной дозировкой для ОП и плевродеза в 1,8 раза больше.

Таким образом, проведенные исследования дали возможность рассчитать терапевтический индекс каталитической системы ТФ+АК при увеличенных соотношениях с АК.

Рассчитанный по соотношению максимально переносимой и эффективной плевросклерозирующей дозы АК в каталитической паре с фиксированной дозой ТФ ТИ=1,82 (табл. 6).

При сравнении с каталитической парой при соотношении 1 : 10, где ТИ=1,26, видно, что терапевтическая широта выросла почти в 1,5 раза. Это означает, что при фиксированной относительно невысокой терапевтической дозе ТФ увеличение дозы АК не только не влечет за собой ухудшения переносимости воздействия, но и расширяет терапевтические возможности каталитической системы.

Заключение

Экспериментальное изучение эффективности каталитических систем, в которых в качестве катализаторов выступают ТФ, Ок и Эф, а восстановителем – АК, на экспериментальных моделях опухолевых плевритов и плевродеза с оценкой «острой» токсичности показало, что перспективны для клинического изучения ТФ+АК и ОК+АК.

Эфитер в каталитической паре с АК в использованных дозировках не дает значимого противоопухолевого эффекта на экспериментальной модели ОП. Пара ТФ+АК эффективно индуцирует плевродез с полной облитерацией плевральной полости без признаков плевропульмонального шока. Лучшие терапевтические характеристики ТФ+АК имеет при молярном соотношении компонентов 1 : 100, ТИ улучшается почти в 1,5 раза.

Литература

1. Андропова Н.В. Моделирование и лечение опухолевого плеврита на мышах. Автореферат канд. дисс. – М., 1996. – 24 с.
2. Андропова Н.В., Трещалин И.Д., Трещалина Е.М., Герасимова Г.К. Противоопухолевое и склерозирующее действие каталитической системы терафтал+аскорбиновая кислота // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 13.
3. Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Сыркин А.Б. Моделирование опухолевого плеврита на мышах // Вестник ОНЦ АМН России. – 1993. – Вып. 1. – С. 10–3.
4. Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Сыркин А.Б. Модель опухолевого плеврита для скрининга // Материалы 1 Съезда Онкологов стран СНГ. – Москва, 1996. – ч.1. – С. 50.
5. Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Сыркин А.Б. Модель плевродеза на мышах для отбора склерозирующих веществ // III Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». – Москва, 1996. – ч.1. – С. 66.
6. Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Сыркин А.Б. и др. Сравнительная оценка склерозирующего и токсического действия нового противоопухолевого препарата ЛХТА-3 // Сб. «Химиотерапия опухолей в СССР». – 1993. – Вып. 60. – С. 109–15.
7. Бутенин А.В., Ворожцов Г.Н., Золотавкина Ю.Б. и др. Способ подавления роста опухолей. Патент РФ № 2376999. – 2009.
8. Ворожцов Г.Н.; Калинин А.Н.; Лужсков Ю.М. и др. Эфиры окта-4,5-карбоновой кислоты фталоцианина кобальта, их комплексы включения с пропиленгликолем эфиром β-циклодекстрина и способ подавления опухолевого роста. Патент РФ № 2172319. – 2001.
9. Кульбачевская Н.Ю. Токсикологическая характеристика бинарной каталитической системы терафтал+аскорбиновая кислота (клинико-экспериментальное исследование). – Канд. дисс. – 2008. – 180 с.
10. Панкратов А.А. Противоопухолевая эффективность и токсичность бинарных каталитических систем на основе металлокомплексов кобальта: Экспериментальное исследование. – Канд. дисс. – 2002. – 164 с.
11. Трещалина Е.М. Рациональные подходы к изучению противоопухолевой активности веществ природного происхождения. Автореферат докт. дисс. – М., 2002. – 25 с.
12. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Изд. Практическая медицина, 2005. – 272 с.
13. Трещалина Е.М., Андропова Н.В. Новые модели, созданные в ОНЦ для целей экспериментальной химиотерапии. В юбилейном сборнике «Этюды химиотерапии» под ред. В.А.Горбуновой. – М., 2000. – С. 122–7.
14. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Кобляков В.А., Райхлин Н.Т. Новые модели для экспериментальной химиотерапии опухолей // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 701–6.
15. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Михайлова Л.М., Бычков М.Б. Эффективность циклоплатам при внутриплевральном введении // Материалы 1 Съезда Онкологов стран СНГ, Москва, 1996. – ч. 1. – С. 167.
16. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Сыркин А.Б. Использование побочного эффекта циклоплатам при опухолевом плеврите // Тезисы докладов. III Российский национальный Конгресс «Человек и лекарство», Москва, 1996. – С. 292.
17. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Сыркин А.Б., Трещалин И.Д. Противоопухолевое и склерозирующее действие ханерола и мекатрима при внутриплевральном введении мышам. Сб. «Химиотерапия опухолей в СССР». – 1993. – вып. 60. – С. 158–62.
18. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Сыркин А.Б. и др. Эффект нового противоопухолевого препарата ЛХТА-31 при внутриплеврально растущих опухолях мышей. Сб. «Химиотерапия опухолей в СССР». – 1993. – вып. 60. – С. 116–20.
19. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. – В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/под общей ред. член-корр.РАМН проф. Р.У.Хабриева. – 2 изд. – М.: ОАО изд. «Медицина», 2005. – С. 637–51.
20. Трещалина Е.М., Полоцкий Б.Е., Андропова Н.В., Сыркин А.Б. Доксидиклин в лечении опухолевого плеврита при раке легкого // Тезисы докладов IV Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 1996. – С. 296.
21. Treshalina N., Andronova N., Polotsky B., Syркин A. Experimental malignant pleurisy in mice. Abstracts of Seventh International Congress on anti-cancer treatment. – Paris – France. – 1997. – P. 242.
22. Чиссов В.И., Панкратов А.А., Болотина Л.В. и др. Бинарная каталитическая терапия злокачественных опухолей с использованием оксикобаламина и аскорбиновой кислоты: от эксперимента к клинике // Медико-Фармацевтический Форум. – 2003. – http://expopress.ru/~expopress/2003/mff/mff03_tez_ltherop1.php
23. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Кармакова Т.А. и др. Бинарные каталитические системы как новые противоопухолевые средства // Российский онкологический журнал. – 2000. – № 6. – С. 23–6.
24. Якубовская Р.И., Панкратов А.А., Чиссов В.И. и др. Разработка методов лечения злокачественных новообразований на основе фотофизических и фотохимических процессов // VII съезд онкологов России. – Сборник материалов. – ч.3. – С. 87–9.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.5-001.16:617.713-002

А.Н. Хлебникова¹, Е.В. Селезнева¹, Л.Е. Гуревич², М.А. Бобров², Г.Э. Баграмова³**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЕРАТИНОЦИТОВ И РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ДЕРМАЛЬНОГО ЭЛАСТОЗА ПРИ АКТИНИЧЕСКОМ КЕРАТОЗЕ**¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва²МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва³ФПК МР РУДН, Москва**Контактная информация:**

Селезнева Елена Владимировна, аспирант кафедры кожных и венерических болезней ФППОВ ПМГМУ им. И.М. Сеченова

адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2, стр.2; тел. +7(495)631-01-63

e-mail: selezneva-elena@mail.ru

Статья поступила: 14.10.2011; подписана в печать: 18.01.2012.

Резюме

Актинический кератоз (АК) – это факультативный предраковый дерматоз, возникающий вследствие избыточной инсоляции и характеризующийся диспластическими изменениями эпидермиса и наличием в подлежащей дерме солнечного эластоза. Цель исследования – определение зависимости между степенью распространенности солнечного эластоза и уровнем пролиферации в эпидермисе методом иммуногистохимического анализа. В исследование был включен биопсийный материал, взятый у 35 пациентов из очагов АК. Иммуногистохимическая реакция проводилась с антителами к маркеру пролиферации Ki-67 и к эластину. Зона эластоза по наличию и распространенности в дерме подразделялась на узкую (занимающую сосочковый и верхние отделы ретикулярного слоя дермы), широкую (до глубоких слоев ретикулярной дермы) и тотальную (на всю толщину дермы). В результате проведенного исследования было установлено, что в очагах с узкой зоной эластоза отмечался низкий индекс пролиферации кератиноцитов, при этом экспрессия Ki-67 визуализировалась преимущественно в базальном и супрабазальном отделах эпидермиса. В опухолях с широкой и тотальной зонами эластоза регистрировалась средняя пролиферативная активность, а Ki-67 распределялся на протяжении шиповатого слоя или на всю толщину эпидермиса. Полученные нами данные свидетельствуют о зависимости между уровнем эластоза в дерме и пролиферативной активностью кератиноцитов: чем более распространенным является эласто́з, тем значительно́е пролиферативный потенциал клеток при АК. Таким образом, уровень солнечного эласто́за может быть полезным морфологическим маркером в оценке пролиферативной активности кератиноцитов в очагах АК и, следовательно, свидетельствовать о степени прогрессирования опухолевых изменений.

Ключевые слова: актинический кератоз, солнечный эласто́з, Ki-67, эластин.A.N. Khlebnikova¹, E.V. Selezneva¹, L.E. Gurevitch², M.A. Bobrov², G.E. Bagramova³**THE STUDY OF ACTINIC KERATOSIS CELL PROLIFERATION AND DERMAL ELASTOSIS PREVALENCE CORRELATION**¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University²M.F. Vladimirovskiy Moscow Region Clinical Research Institute³Peoples' Friendship University of Russia, Moscow**Abstract**

Actinic keratosis (AK) is a premalignant lesion caused by ultraviolet (UV) radiation and characterized by epithelial and connective tissue alterations. Objective and Methods: To examine the potential relationship between connective tissue degeneration and cell proliferation in epithelial cells. 35 cases were immunohistochemically analyzed for the expression of Ki-67 and elastin. Dermal elastosis was divided into three areas (zones) according to its prevalence: narrow area – elastosis located in papillary dermis and upper layers of reticular dermis; wide area – up to the deep layers of the reticular dermis; and total area – equal to dermis width. Results: The increase in the solar elastosis grade was associated with an increase in positive cell numbers for Ki-67. A low proliferative activity of epidermal cells was observed in lesions with the narrow area of elastosis, whereas the moderate activity was found in actinic keratoses with the wide and the total areas of elastosis. Basal and suprabasal expression predominated in the lesions with narrow area of connective tissue degeneration; expression in spinosum layer and full-thickness of epidermis was prevalent in the lesions with wide and total areas of degeneration.

These results demonstrate that the epithelial expression of cell proliferation is augmented with the increase of the solar elastosis grade. Thus, the grade of solar elastosis could be a helpful morphologic marker in the assessment of neoplastic changes in sun-damaged skin.

Key words: actinic keratosis, solar elastosis, Ki-67, elastin.**Введение**

Актинический (или солнечный) кератоз (АК) – это факультативный предраковый дерматоз, встречающийся преимущественно у светлокотых, пожилых людей, длительное время подвергавшихся

избыточной инсоляции. Частота его трансформации в плоскоклеточный рак кожи наблюдается в 0,1–20 % случаев [5; 20; 24]. В ряде публикаций отмечалось, что плоскоклеточная карцинома кожи в 60 % случаев развивается именно из очагов АК, тогда как только 40 % образуются *de novo* [17].

Основополагающим фактором, способствующим развитию АК, является ультрафиолетовое излучение, патогенетическая роль которого заключается в повреждении ДНК клеток эпидермиса, что ведет к неконтролируемому росту и делению генетически дефектных и, следовательно, потенциально опухолевых, кератиноцитов [3].

Основным морфологическим проявлением АК является внутриэпидермальная дисплазия [9]. В одних случаях наблюдаются изменения, затрагивающие только базальный и парабазальный слои, в других – занимающие всю толщину эпидермиса и имитирующие болезнь Боуэна (рак *in situ*) [9; 13].

УФ-спектр повреждает и соединительнотканые структуры дермы, в результате чего в очагах АК в ее верхних отделах при патоморфологическом исследовании отмечаются признаки «эласто́за», проявляющиеся в виде очаговых или диффузных скоплений аморфных, базофильных бесструктурных масс. Ряд исследователей предполагал, что существует определенная зависимость между степенью внутриэпидермальной дисплазии и проявлениями эласто́за в дерме при АК.

Однако подобные исследования единичны и результаты их противоречивы и неоднозначны.

Уровень пролиферативной активности клеток считают одним из наиболее показательных маркеров агрессивного роста опухоли.

Многочисленные исследования опухолей из различных тканей свидетельствуют об относительно невысокой пролиферативной активности клеток доброкачественных новообразований, в то время как злокачественные процессы имеют высокий уровень пролиферации [7; 21]. Пролиферативная активность возрастает в низкодифференцированных опухолях по сравнению с высокодифференцированными [14].

Оценку пролиферативной активности клеток используют в дифференциальной диагностике новообразований, в определении прогноза, диктующих стратегию и тактику лечения. ИГХ-исследование является наиболее информативным способом визуализации и оценки пролиферативной активности клеток, поскольку маркеры выявляют не только клетки собственно в митозе, но и находящиеся в процессе подготовки к делению и, следовательно, свидетельствуют о пролиферативном потенциале [1; 2].

В настоящее время широко используют маркер Ki-67 – ядерный негистоновый белок, представленный двумя различными формами с ММ 320 и 359 кДа, экспрессия которого строго связана с клеточной пролиферацией и определяется в клетках, находящихся в стадиях клеточного цикла G₁, S, M, G₂ [18].

Кроме того, иммуногистохимическое исследование позволяет объективно оценить характер «эласто́за» в дерме посредством визуализации распределения эластина, который совместно с фибриллярными белками и фибронектином является главным компонентом базофильного аморфного материала [27].

Цель исследования – определение зависимости между степенью распространенности дермального эласто́за и уровнем пролиферации в эпидермисе методом ИГХ-анализа.

Материалы и методы

В исследование был включен биопсийный материал, взятый у 35 пациентов (28 женщин и 7

мужчин в возрасте от 56 до 86 лет) из очагов АК, расположенных на коже лица.

Иммуногистохимическая реакция проводилась с антителами к эластину (разведение 1 : 100, Novocastra) и к маркеру пролиферации Ki-67 (разведение 1:75, Dako).

Для визуализации реакции на срезы наносили DAB⁺ (3,3 диаминобензидин) (ДАКО), что позволяло получать специфическую коричневую окраску, после чего в течение 2–5 мин докрашивали гематоксилином Майера.

Зона эласто́за по наличию и распространенности в дерме подразделялась на узкую (занимающую сосочковый и верхние отделы ретикулярного слоя дермы), широкую (до глубоких слоев ретикулярной дермы) и тотальную (на всю толщину дермы). Индекс пролиферации Ki-67 определяли как среднее значение от числа меченых ядер на 500–1000 учтенных в нескольких полях зрения.

Пролиферативная активность кератиноцитов оценивалась как низкая (до 30 % меченых ядер), средняя (30–60 % ядер) и высокая (>60 % ядер).

Также отмечали уровень экспрессии Ki-67 в зависимости от его распределения в эпидермисе: в базальном и супрабазальном слоях, на протяжении шиповатого слоя, на всю толщину эпидермиса.

Для обработки данных использовались методы:

- определение средней величины;
- доверительный интервал; – t-критерия Стьюдента с поправкой для множественных значений.

Результаты и обсуждение

Индекс пролиферации кератиноцитов варьировал от 11,5 до 57,6 %. Средний индекс пролиферации составил 30,4±10,4 %.

Низкая пролиферативная активность кератиноцитов регистрировалась в 18 (51 %) случаях, из которых в 17 (94 %) – экспрессия Ki-67 отмечалась в базальном и супрабазальном слоях эпидермиса (рис. 1; см. вклейку), в 1 (6 %) – в шиповатом слое (рис. 2).

Средняя пролиферативная активность выявлялась в 17 (49 %) очагах АК, при этом в 12 (70 %) случаях распределение маркера Ki-67 отмечалось на всем протяжении шиповатого слоя, в 4 (24 %) – на полную толщину эпидермиса (рис. 3) и только в 1 (6 %) – в базальном слое (рис. 4).

Случаев АК с высокой пролиферативной активностью выявлено не было.

В 100 % случаев в дерме определялся эластин, распределение носило диффузный характер в виде сплошной равномерно окрашенной полосы. При этом в 18 (51 %) очагах АК отмечалась узкая зона эласто́за (рис. 5), в 14 (43 %) – широкая (рис. 6), и в 3 (6 %) – тотальная (рис. 7).

Среди случаев с широкой зоной «эластотических» изменений отмечалось 3 (20 %) случая с располагающимся в сосочковом слое дермы полосовидным лимфоцитарным инфильтратом.

В препаратах АК с узкой зоной эласто́за в 17 случаях (94 %) отмечалась низкая пролиферативная активность кератиноцитов, и в 1 образце (6 %) – средняя.

Причем в 16 (88 %) срезах выявлялась базальная и супрабазальная экспрессия маркера Ki-67, и только в 2 случаях (12 %) меченые ядра клеток регистрировались на всем протяжении шиповатого слоя эпидермиса (см. табл., рис. 8).

Таблица

Относительная пролиферативная активность кератиноцитов при различных типах проявления эластоза.

Индекс пролиферации Ki-67	Узкая зона эластоза (n=18)	Широкая зона эластоза (n=14)	Тотальная зона эластоза (n=3)
Низкий (n=18)	17(94%)	1(8%)	–
Средний (n=17)	1(6%)	13 (92%)	3(100%)

В группе АК с широкой зоной эластоза в 13 образцах (93 %) определялся средний уровень пролиферации, и в 1 препарате (7 %) – низкий. При этом в 8 срезах (57 %) распределение Ki-67 отмечалось в шиповатом слое эпидермиса, в 4 случаях (29 %) – на полную толщину эпидермиса, и в 2 (14 %) – в базальном и супрабазальном отделах (см. таблицу, рис. 8).

Во всех препаратах АК с тотальной зоной эластоза выявлялся средний уровень пролиферации, при этом в 2 (66,7 %) образцах Ki-67 экспрессировался на всем протяжении шиповатого слоя эпидермиса и в 1 (33,3 %) случае – на всю толщину эпидермиса (см. таблицу, рис. 8).

В результате статистической обработки данных было установлено, что с вероятностью 95 %-ный ДИ среднего значения индекса пролиферации в образцах с узкой зоной эластоза составил $(21,3 \pm 3)$ %, то есть находился в пределах от 18,3 до 24,3 %; с широкой зоной – $(39,4 \pm 5,3)$ % – от 34,1 до 44,7 % и с тотальной зоной – $(44,2 \pm 2,9)$ % от 41,3 до 47,1 % (рис. 9).

Сравнительный анализ средних величин пролиферативной активности кератиноцитов при АК выявил, что случаи с широкой и тотальной зонами «эластотических изменений» имеют существенно более высокий уровень Ki-67⁺ позитивных клеток, чем с узкой зоной ($p < 0,05$). Напротив, различие между средними значениями пролиферации в образцах солнечного кератоза с широкой и тотальной зонами эластоза статистически не достоверно ($p > 0,05$).

В настоящем исследовании в эпидермисе при АК средний индекс пролиферации составил $30,4 \pm 10,4$ %, при этом 18 (51 %) опухолей имели низкую пролиферативную активность клеток и 17 (49 %) – среднюю. Полученные нами данные не противоречат результатам других исследователей, в экспериментах которых средний индекс пролиферации при АК варьировал от 23,7 до 31 % [4; 22; 25; 26;]. Ранее было отмечено, что Ki-67⁺ клетки располагались в нормальном эпидермисе в базальном слое, при АК преимущественно в базальном и супрабазальном слоях, занимая половину толщины эпидермиса, а при болезни Бовена определялись на всю толщину эпидермиса [4]. Аналогичную локализацию Ki-67⁺ клеток отмечали S. Talghini et al., которые констатировали, что исключительно базальный слой эпидермиса нормальной кожи содержал пролиферирующие клетки, а индекс его пролиферации не превышал 1 % [25]. Глубокие слои эпидермиса при АК содержали 28,8 % пролиферирующих клеток, тогда как поверхностные – 8,4 %. При болезни Бовена Ki-67⁺ клетки равномерно распределялись по всей толщине эпидермиса, индекс пролиферации глубоких и поверхностных слоев составлял 13 и 12 % соответственно. Различный характер распределения пролиферирующих клеток в эпидермисе при АК и болезни Бовена предлагали использовать в качестве дополнительного дифференциально-диагностического критерия [4; 25].

В нашем исследовании в 18 (51 %) случаях Ki-67⁺ клетки располагались в базальном и супрабазальных слоях, в 13 (37 %) на ширину шиповатого слоя и в 4 (12 %) – на всю толщину эпидермиса. Экспрессия Ki-67 в базальном и супрабазальном слоях эпидермиса регистрировалась в 17 (94 %) опухолях с низким индексом пролиферации. Опухоли со средней пролиферативной активностью клеток в 70 % случаях экспрессировали маркер Ki-67 на всем протяжении шиповатого слоя, в 24 % – на полную толщину эпидермиса и только в 6 % – исключительно в базальном слое. Наши данные свидетельствуют, что в АК маркер Ki-67 может экспрессироваться не только клетками базального и шиповатого слоев (что подчеркивалось в других исследованиях), но и клетками всех слоев эпидермиса. Необходимо отметить, что предыдущие исследования проводились на ограниченном количестве материала (не более 15 случаев). Вероятно, выявить опухоли с локализацией пролиферирующих клеток на всю толщину эпидермиса нам позволил анализ значительно большего количества материала. Кроме того, прослеживается определенная тенденция, свидетельствующая о повышении индекса пролиферации при распространении пролиферирующих клеток в шиповатый и более поверхностные слои эпидермиса.

Солнечный эластоз рассматривают в качестве объективного признака повреждающего воздействия хронической инсоляции [16]. Он является обязательным морфологическим признаком АК. Во всех случаях АК мы выявляли его в дерме. При этом в 18 (51 %) очагах АК эластин распределялся в поверхностной дерме и в 17 (49 %) очагах – в срединных и глубоких ее отделах. Эластотические изменения дермы определяли и в других эпителиальных опухолях кожи 16: 10; 19:1. Так, в очагах плоскоклеточного рака кожи в 97,3 % случаев регистрировали эластоз, который в 82 % случаев распространялся на срединные и глубокие отделы дермы, а в некоторых случаях обнаруживается и в стенках сосудов [10]. В 93 % очагов базальноклеточной карциномы визуализировались признаки «эластотических» изменений, локализующихся как в очагах и по периферии самой опухоли, так и в окружающей ее непораженной ткани [11; 28]. Распространение эластога до срединных и глубоких отделов дермы отмечали в 67 % случаев базально [28].

Данные результаты подтверждают, что основным фактором в патогенезе как АК, так и плоскоклеточного и базальноклеточного рака кожи, является длительная и интенсивная инсоляция.

При злокачественных эпителиальных опухолях кожи эластоз в дерме был более выражен по сравнению с АК, что косвенно может подтверждать наличие взаимосвязи между распространенностью солнечного эластога и злокачественным потенциалом опухоли.

Сопоставив степень распространенности эластога в дерме и уровень пролиферации кератиноцитов в очагах АК, мы установили: в очагах с узкой зоной эластога средний индекс пролиферации составил $21,3 \pm 3$ %, а экспрессия Ki-67 визуализировалась в 88 % случаев, преимущественно в базальном и супрабазальном отделах эпидермиса. В то время, как в опухолях с широкой и тотальной зонами эластога индекс пролиферации составил $39,4 \pm 5,3$ % и $44,2 \pm 2,9$ % соответственно, распределение Ki-67 отмечалось на протяжении шиповатого слоя или на всю толщину эпидермиса в 86 и 100 % случаев соответственно.

Полученные нами данные свидетельствуют о зависимости между уровнем эластола в дерме и пролиферативной активностью кератиноцитов: чем более распространенным является эластоз, тем значительнее пролиферативный потенциал клеток при актиническом кератозе. Ранее была установлена корреляция между уровнем эластола в дерме и степенью дисплазии кератиноцитов при АК и болезни Бовена [8]. Количество атипичных эластиновых волокон в дерме при дисплазии II–III степени при АК и при болезни Бовена составило 35,5; 40,7 и 48,1 % соответственно. Обратную зависимость между уровнем эластола и агрессивным течением опухоли отмечали при меланоме. Согласно современным представлениям о ее патогенезе, одну из ключевых ролей в развитии играют мутации в генах BRAF, приводящие к чрезмерному делению клеток. Данные генетические изменения чаще всего регистрировались при меланоме с отсутствием и/или незначительными явлениями эластола [15; 23]. Кроме того, в таких опухолях отмечались более высокий уровень инвазии по Кларку, а также значительное количество пораженных лимфоузлов и отдаленных метастазов [12]. Напротив, в очагах, длительно находящихся под воздействием избыточной инсоляции и имеющих «эластотические» изменения в дерме, мутации в BRAF встречались гораздо реже [15; 23]. При этом течение меланомы имело относительно благоприятный характер [12].

Литература

1. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Современные возможности молекулярно-биохимических методов оценки биологического «поведения» рака молочной железы // Вестн. РАМН. – 2001. – № 9. – С. 65–70.
2. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – Казань, 2004. – 452 с.
3. Anwar J., Wrona D.A., Kimyai-Asadi A., Alam M. The development of actinic keratosis into squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes // Clin Dermatol. – 2004. – 22. – P. 189–96.
4. Bordbar A.D., Cabral A., Beck S., Boon M.E. Assessment of cell proliferation in benign, premalignant and malignant skin lesions // Applied Immunohistochem. Mol. Morphol. – 2007. – 15. – P. 229–35.
5. Callen J.P., Bickers D.R., Moy R.L. Actinic keratoses // J Am Acad Dermatol. – 1997. – 36. – P. 650–3.
6. Carey F.A., Hogan J.M. The relationship of... // Ir J Med Sci. – 1990. – 159. – P. 44–7.
7. Chaichamnan K., Satayasoontorn K., Puttanupab S., Attainsee A. Malignant proliferating trichilemmal tumors with CD34 expression // J Med Assoc Thai. – 2010. – 93, Suppl 6. – S28–34.
8. Chang Geun Cho, Ho Yeun Jo, Hyun Chul Choi et al. A Study of the Solar Effect on Actinic Keratoses by Quantification of Elastic Fibres Using an Image Analysis System // Acta Derm Venereol. – 1999. – 79. – P. 278–80.
9. Cockerell C.J., Wharton J.R. New histopathological classification of actinic keratosis // Journal of Drugs in Dermatology. – 2005. – 4(4). – P. 462–7.
10. Corbalán-Vélez R., Ruiz-Macia J.A. et al. Solar Elastosis in Cutaneous... // Actas Dermosifiliogr. – 2010. – 101(6). – P. 517–23.
11. Daavis M., Pandeya N., Whiteman D.C., Green A.C. Basal cell carcinoma on the trunk is associated with excessive sun exposure // J Am Acad Dermatol. – 2007. – 56. – P. 380–6.
12. Feinmesser M., Schachter J.M., Tobar A. et al. Relationship of tumorigenic malignant melanomas to dermal elastin: an expression of tumor/stromal interaction that may be related to prognosis // Am J Dermatopathol. – 2002. – 24. – P. 108.
13. Hashimoto K., Mehregan A.H. Tumors of the epidermis. – Arnold Publishing, 1990. – 270 p.
14. Jensen V., Prasad A.R., Smith A. et al. Prognostic criteria for squamous cell cancer of the skin // J Surg Res. – 2010. – 159(1). – P. 509–16.
15. Maldonado J.L., Friedlyand J., Patel H. et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas // J Natl Cancer Inst. – 2003. – 95. – P. 1878.
16. Mera S.L., Lovell C.R., Russell R. Jones, Davies J.D. Elastic fibres in normal and sun-damaged skin: an immunohistochemical study // British Journal of Dermatology. – 1987. – 117. – P. 21–7.
17. Mittelbronn M.A., Mullins D.L., Ramos-Caro F.A., Flowers F.P. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous SSC // Int J Dermatol. – 1998. – 37(9). – P. 677–81.
18. Molino A., Micciolo R., Turazza M. et al. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: association with clinical and pathological variables and prognosis // Int. J. Cancer. – 1997. – 74. – P. 433–7.
19. Moon J.S., Oh C.H. Solar damage in skin tumors: quantification of elastotic material // Dermatology. – 2001. – 202. – P. 289–92.
20. Moy R.L. Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma // J Am Acad Dermatol. – 2000. – 42(1 Pt 2). – P. 8–10.
21. Nazarian R.M., Kapur P., Rakheja D. et al. Atypical and malignant hidradenomas: a histological and immunohistochemical study // Mod Pathol. – 2009. – 22(4). – P. 600–10.
22. Philip M., Carpenter, Kenneth G. Linden, Christine E. McLaren et al. Nuclear Morphometry and Molecular Biomarkers of Actinic Keratosis, Sun-Damaged, and Nonexposed Skin // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2004. – 13(12).
23. Pollock P.M., Harper U.L., Hansen K.S. et al. High frequency of BRAF mutations in nevi // Nat Genet. – 2003. – 33. – P. 19.
24. Salasche S.J. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma // J Am Acad Dermatol. – 2000. – 42(1 Pt 2). – P. 4–7.
25. Talghini S., Halimi M., Baybordi H. Expression of p 27, Ki 67, p 53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2009. – 12(12). – P. 929–33.
26. Tilli C.M., Ramaekers F.C., Broers J.L. et al. Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and Bowen disease // Br. J. Dermatol. – 2003. – 148. – P. 102–9.
27. Virginia L. Chen et al. Immunohistochemistry of Elastotic Material in Sun-Damaged Skin // J Invest Dermatol. – 1986. – 87. – P. 334–7.
28. Zaynoun S., Ali L.A., Shaib J., Kurban A. The relationship of... // J Am Acad Dermatol. – 1985. – 12. – P. 522–5.

Выводы

При АК средний индекс пролиферации составил 30,4±10,4 %. Ki-67+ клетки располагались в базальном и супрабазальном слоях в 51 % случаев, на ширину шиповатого слоя – в 37 % и на всю толщину эпидермиса – в 12 % случаев. При АК в 100 % случаев в дерме определялся эластин, при этом в 51 % очагов он распределялся в сосочковом слое (узкая зона), в 43 % – до середины сетчатого (широкая зона) и в 6 % – тотально по всей дерме. В очагах с узкой зоной эластола индекс пролиферации составил 19,3±9,3 %, а экспрессия Ki-67 визуализировалась в 88 % случаев, преимущественно в базальном и супрабазальном отделах эпидермиса. В опухолях с широкой и тотальной зонами эластола индекс пролиферации составил 42,3±12 и 44,2±12 % соответственно, при этом распределение Ki-67 отмечалось на протяжении шиповатого слоя или на всю толщину эпидермиса в 86 % случаев и 100 % случаев соответственно.

Установлена взаимосвязь между степенью пролиферации эпидермиса и выраженностью дермального эластола при АК. Таким образом, уровень солнечного эластола может быть полезным морфологическим маркером в оценке пролиферативной активности кератиноцитов в очагах АК и, следовательно, свидетельствовать о степени прогрессирования опухолевых изменений.

УДК 612.411/418:615.275.2

*А.В. Таллерова, Л.П. Коваленко, А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин***ВЛИЯНИЕ ЛАДАСТЕНА НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ Т-ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ТРЕВОЖНОЙ ДЕПРЕССИИ***НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, Москва***Контактная информация***Таллерова Анна Владимировна, научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии***адрес:** 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; **тел.** +7(495)601-21-27**e-mail:** annatall@rambler.ru

Статья поступила 10.06.2011; подписана в печать 18.01.2012.

Резюме

Исследовано влияние антиастенического препарата ладастен (N-(2-adamantyl)-N-(para-bromophenyl)-amine) при 5-дневном в/б введении в дозе 30 мг/кг на субпопуляционный состав лимфоцитов селезёнки и поведение мышей самцов линии C57BL/6 в условиях хронического стрессирования по методу зоосоциального конфликта.

После 20 дней стрессирования животных наблюдали снижение индекса массы тимуса, процентного содержания Т-хелперной субпопуляции лимфоцитов селезёнки (CD4+CD8-), снижение всех параметров спонтанной двигательной активности, увеличение выраженности тревожного поведения в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) и депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание» по Porsolt (ПП).

Пятидневное введение ладастена в дозе 30 мг/кг в/б мышам самцам линии C57BL/6, начиная с 16 дня стрессирования способствовало достоверному уменьшению выраженности тревожно-депрессивного состояния и восстанавливало субпопуляционный состав Т-лимфоцитов селезёнки до контрольных значений.

Полученные результаты определяют перспективы разработки показаний для применения ладастена в качестве средства иммунокоррекции при депрессии.

Ключевые слова: ладастен, тревожно-депрессивное состояние, поведение, лимфоциты.*A.V. Tallerova, L.P. Kovalenko, A.D. Durnev, S.B. Seredenin***THE INFLUENCE OF LADASTEN ON SPLEEN T-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND BEHAVIOR OF MALE MICE C57BL/6 IN EXPERIMENTAL MODEL OF ANXIOUS DEPRESSION STATE***Zakusov Institute of Pharmacology RAMS, Moscow***Abstract**

The aim of the study was to investigate the effects of antiastenic drug Ladasten (N-(2-adamantyl)-N-(para-bromophenyl)-amine) on spleen T-lymphocytes subpopulations and behavior depressed male mice C57BL/6.

Anxious depression state forming by repeated fights in male mice, the zoo-social conflicts. Ladasten (30mg/kg, i.p.) administered 5 days after 15 days fights. To determine spleen T-lymphocyte subpopulations we used 3-colors (CD3-FITC/CD4-PE/CD8-PeCy5) stained by flow cytometry method. Spontaneous motor activity measured in an IR Actimeter, elevated plus-maze (EPM) used to assess anxiety. Forced swimming test by Porsolt (FST) by video-based motor activity analysis system used for evaluate depression state. Parameters analyzed after 24h last drug injections. For statistic analyses we used Student's t-test and Mann-Whitney U test.

After 20 days stressed mice recorded decreased thymic index, percentage of splenocytes CD4⁺CD8⁻, spontaneous motor activity, detected increased anxiety in EPM and depression state in FST.

5 days ladasten administration from 16 day stress male mice C57BL/6 significantly limit anxious depressive state development and led percentage of spleen T-lymphocyte subpopulations to control meanings.

Thus findings suggest antiastenic drug ladasten is a possible drug-candidate for immunocorrection of depression.

Key words: ladasten, anxious depression state, behavior, lymphocytes.**Введение**

Активный в последние годы установлен роль иммунной дисрегуляции в патогенезе депрессии [2; 4; 6]. В частности, у больных депрессией выявлены различные иммунные сдвиги в виде дисбаланса субпопуляционного состава Т-лимфоцитов со снижением числа циркулирующих в периферической крови Т-хелперов (Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺), поляризации состава внутри Т-хелперной популяции (Th₁/Th₂) в сторону Th₂, угнетения фагоцитарных реакций макрофагов и нейтрофилов, повышения содержания в крови маркеров воспаления [2; 6; 9; 10; 11]. Применение современных антидепрессантов позволяет устранить

клиническую симптоматику, характерную для глубоких депрессивных состояний, однако при этом не отмечается восстановления иммунных показателей в полном объеме, что многие авторы считают причиной возникновения рецидивов депрессии [4; 6; 15]. Ряд авторов полагают целесообразным введение в фармакотерапию депрессии иммуномодулирующих препаратов, нормализующих иммунологические показатели [6].

В наших исследованиях ранее было установлено нормализующее влияние противоастенического препарата ладастен на содержание цитокинов ряда Th₂: IL-4, IL-6 и IL-17 в сыворотке крови у мышей самцов линии C57BL/6 в экспериментальной модели тревожной депрессии [16].

Целью настоящей работы явилось исследование эффекта ладастена на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов селезёнки и поведение самцов мышей линии C57BL/6, находящихся в условиях хронического психоэмоционального стресса на стадии глубокого тревожно-депрессивного состояния.

Материалы и методы

Ладастен N-(2-адамантил)-N-(п-бромфенил)-амин синтезирован и фармакологически изучен в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН [2]. У препарата выявлены психостимулирующая, ангиолитическая и иммуностропная активности [3].

Опыты проведены на мышках самцах линии C57BL/6 массой 18–20 г (питомник «Столбовая» РАМН). Животных содержали в стандартных условиях в виварии НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН со свободным доступом к корму и воде.

Для формирования тревожно-депрессивного состояния у самцов мышей линии C57BL/6 использовали модель зоосоциального конфликта, предусматривающую ежедневные конфронтации между самцами в соответствии с описанной методикой; глубокое тревожно-депрессивное состояние с выраженным иммунодефицитом у животных достигается после 20 дней стрессирования [1; 7].

Были сформированы две группы стрессированных самцов по 10 особей в каждой. Первую инъецировали физиологическим раствором, второй вводили пятикратно в/б ладастен в дозе 30 мг/кг, начиная с 16 дня стрессирования, анализ исследуемых параметров проводили через сутки после последнего введения препарата. Выбор дозы ладастена основан на данных проведённых ранее исследований [2; 16].

Параметры двигательной активности регистрировали в течение 3 мин на инфракрасном актиметре PanLab (Испания). Тревожное поведение оценивали по методике ПКЛ. У каждого животного в течение 300 сек регистрировали число заходов и время, проведённое в открытых и закрытых рукавах лабиринта. Увеличение времени нахождения в тёмных отсеках лабиринта по сравнению с контролем расценивали как проявление тревожного поведения [1]. Оценку выраженности депрессивного состояния проводили с помощью видеоустановки ПП по Porsolt НПК Открытая наука (Россия). С помощью программного обеспечения RealTimer в режиме работы с видеозаписью за 5 мин теста оценивали время пассивного плавания (дрейф и полная неподвижность) в воде, а также латентное время до проявления первой иммобильности. Увеличение длительности пассивного плавания мышей и уменьшение латентного времени расценивали как свидетельство выраженности депрессивноподобного состояния [1; 8].

Тимус и селезенку выделяли и взвешивали, результаты выражали в относительных значениях массы органа в мг на 10 г массы мыши.

Оценку субпопуляционного состава Т-лимфоцитов селезенки мышей проводили методом трехцветного цитометрического анализа на проточном лазерном цитометре EPICS XL 4 color (Beckman Coulter, США). Клеточную суспензию спленцитов готовили при помощи стеклянного гомогенизатора, ресуспендирование проводили в физиологическом растворе. К 100 мкл гомогената добавляли расчётное количество моноклональных антител к молекулам CD3-FITC/CD4-PE/CD8-PerCPy5 (eBioScience, Австрия). Инкубировали при комнатной температуре (20–25 °C) 15 мин, для последующего лизиса эритроцитов

в пробу вносили 500 мкл лизирующего реагента Optilyse C. Через 20 мин пробу стабилизировали 500 мкл физиологического раствора. В каждой пробе анализировали не менее 10 000 событий. Результаты обрабатывали в программе WinMDI 2,7 и выражали в процентах клеток, несущих данный маркер.

Статистическую обработку данных проводили по t-критерию Стьюдента и непараметрическому критерию Mann-Whitney U Test.

Результаты и обсуждение

Из данных представленных в табл. 1, следует, что у животных, подвергнутых 20-дневному стрессированию, значительно ($p < 0,05$) изменяются показатели спонтанной двигательной активности. По сравнению с интактными животными у стрессированных самцов, получавших физиологический раствор, на 38 % снижается локомоторная двигательная активность, в 1,4 раз снижается число эпизодов вставания на задние лапы. Кроме того, у самцов опытной группы уменьшается число быстрых движений в 1,5 раза, в 1,3 раза увеличивается время покоя, но при этом возрастает максимальная скорость движения в 1,3 раза и сохраняются величины пройденных дистанций. Таким образом, продолжительные периоды неподвижности сопровождаются кратковременными всплесками активности. Согласно Цикунову С.Г. и др. [8], данное поведение является проявлением тревожности. Также происходит снижение времени пребывания в открытых рукавах ПКЛ в 3,8 раза (табл. 2), уменьшение латентного и увеличение пассивного времени плавания в тесте ПП на 47 и 39 % соответственно (табл. 3).

У стрессированных самцов на фоне введения ладастена восстанавливались все параметры спонтанной двигательной активности до значений, характерных для интактных животных. В тесте ПКЛ на 55 % увеличивалось время пребывания в открытых рукавах (см. табл. 2) и на 24 % увеличивалось латентное время до проявления первой иммобильности в тесте ПП (см. табл. 3).

У животных, подвергнутых стрессированию, по сравнению с интактными особями наблюдалось уменьшение в 1,5 раза массы тимуса. Значимого изменения массы селезёнки не наблюдалось (табл. 4). При этом в селезёнке было снижено процентное содержание Т-клеток ($CD3^+$ фенотип) на 13 %, за счёт значимого снижения на 22 % ($p < 0,05$) Т-хелперной субпопуляции лимфоцитов ($CD4^+CD8^-$). Уменьшение количества субпопуляции Т-эффекторов ($CD4^+CD8^+$) не носило достоверного характера.

Введение ладастена не влияло на изменение массы лимфоидных органов, вызванное ежедневным стрессированием мышей, но при этом предотвращало снижение содержания Т-лимфоцитов селезёнки, восстанавливало процентное содержание субпопуляции Т-хелперов до контрольных значений (см. рис.). Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что хронический социальный стресс, вызванный повторным опытом социальных поражений у мышей самцов, приводит к развитию тревожно-депрессивного состояния и иммунодефицита проявляющегося в снижении числа Т-клеток $CD3^+$, $CD4^+$ в селезёнке [1; 5; 7].

Пятидневное введение ладастена мышам самцам линии C57BL/6 на стадии выраженной депрессии после 15 дней стрессирования способствовало уменьшению выраженности тревожно-депрессивного состояния и восстанавливало субпопуляционный состав Т-лимфоцитов селезёнки.

Таблица 1
Оценка влияния ладастена на параметры спонтанной двигательной активности экспериментальных мышей самцов линии C57BL/6

Группы (n=10)		Показатель								
		Спонтанная двигательная активность, у.е.		U _{макс} см/с	U _{средн} см/с	Расстояние, см	Время покоя, %	Медленные движения, %	Быстрые движения, %	Число стоек
		Локомоторная двигательная активность	Стереотипное движение							
Интактные мыши		487,0±35,2	90,3±30,0	23,8±6,3	3,7±1,2	667,5±118,8	47,0±3,2	32,5±2,0	20,5±3,2	54,9±5,5
Стрессированные (20 дней) мыши	Физиологический раствор	350,0±31,7*	91,6±29,3	32,1±7,3*	4,1±1,3	737,9±237,6	61,5±3,2*	22,9±4,5	13,6±4,5*	40,2±2,1*
	Ладастен, 30 мг/кг, в/б	460,7±35,1	135,6±36,3	27,3±5,5	5,6±1,6	909,9±261,3	44,7±5,2	30,2±2,9	25,0±6,2	49,7±5,3

U_{макс} и U_{средн} — максимальная и средняя скорости мыши см/с;
*различия достоверны (p<0,05) по сравнению с интактным контролем.
Сравнение по непараметрическому критерию Mann-Whitney, U-Test

Таблица 2

Влияние ладастена на выраженность депрессивного состояния экспериментальных мышей самцов линии C57BL/6 в тесте «принудительное плавание» по Porsolt

Показатель	Мыши		
	Интактные	Стрессированные	
		Физ. р-р	Ладастен, 30 мг/кг, в/б
Латентное время до проявления первой имобильности, сек	85,2±4,6	45,3±12,3*	59,8±15,7 [#]
Дрейф, сек	94,6±13,7	155,2±19,4*	203,6±9,5*
Полная неподвижность, сек	46,6±15,1	51,2±11,1	19,6±7,2* [#]
*различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с интактным контролем; #различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой физиологический раствор. Сравнение по непараметрическому критерию Mann-Whitney, U-Test			

Таблица 3

Влияние ладастена на выраженность тревожного состояния экспериментальных мышей самцов линии C57BL/6 в тесте «ПКЛ»

Показатель	Мыши		
	Интактные	Стрессированные	
		Физ. р-р	Ладастен, 30мг/кг, в/б
Время в открытых рукавах, %	17,2±4,8	4,5±1,7*	10,1±3,6* [#]
Время в закрытых рукавах, %	67,8±5,7	81,8±3,4	77,1±4,4
*различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с интактным контролем; #различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой физиологический раствор. Сравнение по непараметрическому критерию Mann-Whitney U Test			

Таблица 4

Влияние ладастена на индексы массы тимуса и селезёнки экспериментальных мышей самцов линии C57BL/6

Показатель	Мыши		
	Интактные	Стрессированные	
		Физ. р-р	Ладастен, 30мг/кг, в/б
Индекс массы тимуса, мг/10г мыши	22,2±1,0	14,8±2,9*	14,4±2,8*
Индекс массы селезёнки, мг/10г мыши	41,3±2,3	39,4±9,5	70,6±18,9
CD3 ⁺	32,0±0,8	27,9±1,3 [#]	31,3±1,0
CD4 ⁺ CD8 ⁻	21,8±1,0	17,1±1,1 [#]	19,3±0,9
CD4 ⁺ CD8 ⁺	10,7±0,7	9,4±0,5	11,0±0,5
*различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с интактным контролем; #различия достоверны ($p < 0,05$) с интактным контролем по t-критерию Стьюдента			

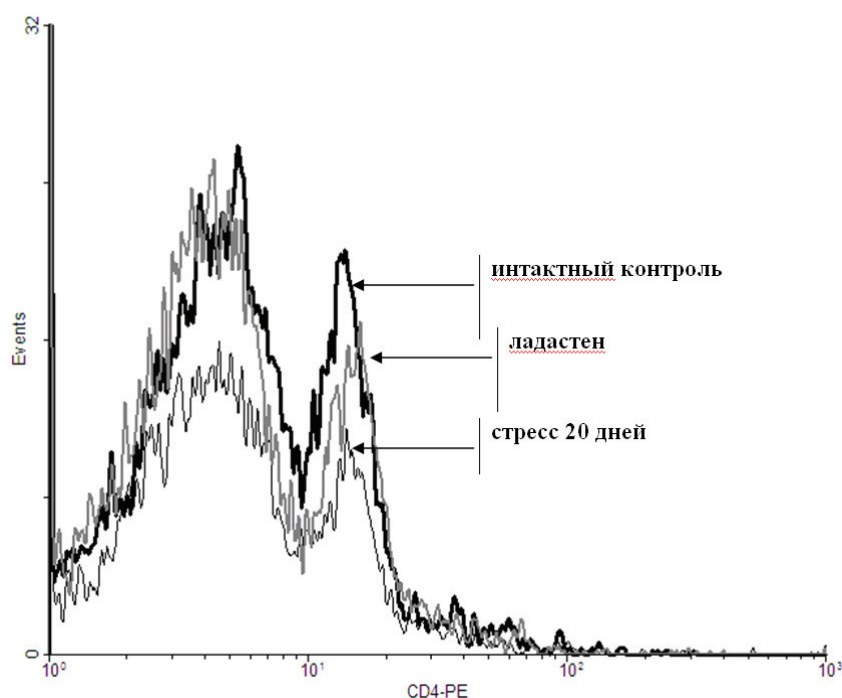


Рис. Оценка влияния ладастена на процентное содержание популяции Т-хелперов (CD4⁺CD8⁺) экспериментальных мышей самцов линии C57BL/6 методом ПЦ (данные см. в табл. 5., стр. 43).

Таблица 5

Гистограмма оценки влияния ладастена на процентное содержание субпопуляции Т-хелперов (CD4⁺CD8⁻) экспериментальных мышей самцов линии C57BL/6 методом проточной цитометрии

Показатель	Интактные мыши	Стрессированные мыши	
		Физиологический раствор	Ладастен, 30мг/кг, в/б
CD3 ⁺	32,0±0,8	27,9±1,3*	31,3±1,0
CD4 ⁺ CD8 ⁻	21,8±1,0	17,1±1,1*	19,3±0,9
CD4 ⁺ CD8 ⁺	10,7±0,7	9,4±0,5	11,0±0,5

*различия достоверны ($p < 0,05$) с интактным контролем по t-критерию Стьюдента

Таким образом, способность противоастенического препарата ладастен при тревожно-депрессивном состоянии предупреждать развитие иммунного дисбаланса определяет перспективы разработки показаний для применения ладастена в качестве средства иммунокоррекции при депрессии.

Выводы

1. Ладастен в дозе 30 мг/кг значительно уменьшает выраженность тревожно-

депрессивного поведения самцов мышей линии C57BL/6, подвергнутых 20-дневному хроническому зоосоциальному стрессу.

2. Пятидневное введение ладастена в дозе 30 мг/кг на стадии выраженной депрессии самцам мышей линии C57BL/6 восстанавливает субпопуляционный состав Т-лимфоцитов селезенки в экспериментальной модели тревожной депрессии у мышей.

Литература

1. Августининович Д.Ф., Алексеенко О.В., Бакитановская И.В. и др. Динамические изменения серотонергической и дофаминергической активности мозга в процессе развития тревожной депрессии: экспериментальное исследование // Успехи физиологических наук. – 2004. – Т. 35, № 4. – С. 19–40.
2. Александровский Ю.А., Казанцева К.В., Ахипкин Р.В. Психоиммунологические исследования в современной психиатрии (Обзор материалов XLVIII международного невролога-психиатрического конгресса) // Фарматека. – 2009. – Т. 181, № 7. – С. 8–12.
3. Вахитова Ю.В., Ямиданов Р.С., Вахитов В.А., Середенин С.Б. Анализ изменения экспрессии генов в головном мозге крыс после однократного воздействия производного 2-аминоадамантина с использованием кДНК макроципов // Молекулярная Биология. – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 276–85.
4. Казанцева К.В. Цитокиновые нарушения при шизофрении и аффективных расстройствах (аналитический обзор) // Фарматека. Спецвыпуск: Психиатрия. – 2008. – Т. 216, № 0(3). – С. 8–14.
5. Кудрявцева Н.Н., Августининович Д.Ф., Бондарь Н.П., и др. Экспериментальный подход к скринингу психотропных препаратов в условиях, приближенных к клиническим (обзор) // Нейронауки. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 5–18.
6. Кутько И.И., Фролов В.М., Рачкаускас Г.С. Новые подходы к лечению депрессивных расстройств // Новости медицины и фармации. – 2007. – Т. 227, № 19. – С. 12.
7. Тендитник М.В., Шурлыгина А.В., Мельникова Е.В. и др. Эффекты диазепама на субпопуляционный состав лимфоцитов иммунокомпетентных органов тревожных самцов мышей // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 4. – С. 46–50.
8. Цикунов С.Г., Клюева Н.Н., Кусов А.Г. и др. Изменения липидного спектра сыворотки крови и печени крыс, вызванные тяжелой психогенной травмой // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, №5. – С. 575–9.
9. Marshall G.D. Internal and external environmental influences in allergic diseases // J. Am. Osteopath. Assoc. – 2004. – 104(5). – P. 1–6.
10. Dunn A.J., Swiergiel A.H., de Beaurepaire R. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2005. – 29(4–5). – P. 891–909.
11. Dantzer R., Bluthé R.-M., Castanon N. Cytokines, Sickness Behavior, and Depression // Psychoneuroimmunology. – 2007. – 4. – P. 281–318.
12. Kim Y.K., Na S.K., Shin K.H., et al. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. – 2007. – 31(5). – P. 1044–53.
13. Leonard B.E., Myint A. Changes in the immune system in depression and dementia: causal or coincidental effects? // Dialogues Clin. Neurosci. – 2006. – 8(2). – P. 163–74.
14. Leonard B.E., Myint A.M. Inflammation and depression: Is there a causal connection with dementia? // Neurotox. Res. – 2006. – 10(2). – P. 149–60.
15. Obuchowicz E., Kowalski J., Labuzek K. et al. Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α release by rat mixed glial and microglial cell cultures // Int. J. Neuropsychopharmacol. – 2006. – 9(1). – P. 27–35.
16. Tallerova A., Kovalenko L., Durnev A., Seredenin S. The study of effects of psychotropic drug Ladasten on LPS-induced changes cytokines profile and behavior in mice C57Bl/6 // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. – 2010. – 107(Suppl. 1). – P. 606.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 615.217:599.323.4

*А.А. Шимширт, Т.С. Калинина, Т.А. Воронина***ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИАЗЕПАМА
НА ТРЕВОЖНЫЕ РЕАКЦИИ У МЫШЕЙ, ВЫЗВАННЫЕ ИНДОМЕТАЦИНОМ***ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН, Москва***Контактная информация:***Шимширт Александр Александрович, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории психофармакологии***адрес:** 125315, Москва, Балтийская ул., д. 8; **тел.** +7(499)601-24-14**e-mail:** spring05-79@yandex.ru

Статья поступила 20.12.2011, подписана в печать 18.01.2012

Резюме

Индометацин в ряде случаев вызывает развитие тревожных расстройств, которые связывают с ингибированием синтеза позитивного модулятора ГАМК_A рецепторов аллопрегнанолон. Впервые показано, что индометацин в однократной дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении вызывает усиление тревоги у мышей-самцов линии Balb/c в стандартном тесте «открытое поле».

Изучена возможность снижения индуцированного индометацином уровня тревожности с помощью классического анксиолитика диазепама. Показано, что диазепам в дозе 1 мг/кг, введенный однократно внутрибрюшинно через 30 мин после индометацина, полностью устраняет тревожные реакции у мышей, вызванные индометацином.

Ключевые слова: индометацин, диазепам, мыши Balb/c, тревожные реакции.*A.A. Shimshirt, T.S. Kalinina, T.A. Voronina***INFLUENCE OF DIAZEPAM
ON THE ANXIETY-LIKE RESPONSES CAUSED BY INDOMETHACIN IN MICE BALB/C***Zakusov Institute of Pharmacology of RAMS, Moscow***Abstract**

There were the cases to observe the development of anxiety following administration of indomethacin. One mechanism suggested of this side drug effect is indomethacin-induced inhibition of the synthesis of the positive modulator GABA_A receptors allopregnanolone. In test «open field» for the first time has shown anxiety in male of inbred mice Balb/c administrated with 10 mg/kg of indomethacin. It was observed the decrease of indomethacin-induced anxiety 30 minute after treatment with classic anxiolytic diazepam with single dose of 1 mg/kg intraperitoneally. There was complete elimination of the anxiety response.

Keywords: indomethacin, diazepam, male of inbred Balb/c, anxiety.**Введение**

Индометацин – НПВС, вызывающее в ряде случаев побочные эффекты в виде тревожных расстройств (анксиогенное действие). В качестве причины этих расстройств обсуждается ингибирование синтеза позитивного модулятора ГАМК_A рецепторов аллопрегнанолон, регулятора, в т.ч. уровня тревожности у человека и животных, а для коррекции предлагаются бензодиазепиновые анксиолитики. [5; 8–10; 13; 15].

Для выявления анксиогенных реакций у лабораторных животных используются различные тесты, например, «открытое поле», приподнятый крестообразный лабиринт, реакции замирания и зоосоциальных взаимодействий [6; 7; 11; 16]. Значение уровня эндогенного аллопрегнанолон в противотревожном действии классического анксиолитика диазепама не описано.

Косвенным подтверждением реализации этого механизма может быть уменьшение или снятие индометацином гипноседативных эффектов диазепама [3; 12].

Поэтому целью настоящего исследования стало изучение влияния индометацина и его комбинации с диазепамом на уровень тревожности в одном из специфических тестов – «открытое поле» у самцов мышей инбредной линии Balb/c.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 54 мышах-самцах линии Balb/c массой тела 20–25 г (питомник РАМН «Столбовая»), содержащихся в виварии института в стандартных условиях при естественной суточной смене день/ночь. Для постановки опыта мышей делили на 6 групп. Основные группы 1 и 2 (n=6) получали индометацин 5 или 10 мг/кг и диазепам 1 мг/кг. Группы положительного контроля 3 (n=7), 4 и 5 получали только индометацин или только диазепам (n=10) в адекватных дозах. Группа отрицательного контроля 6 (n=18) получала физиологический раствор по 0,2–0,25 мл в идентичной схеме введения.

В работе использованы индометацин-субстанция, который вводили мышам однократно внутрибрюшинно за 60 мин до постановки теста, и диазепам-субстанция, который вводили мышам однократно внутрибрюшинно через 30 мин после индометацина. Субстанции веществ и растворитель Twin-80 произведены Sigma Aldrich (США).

Оценка уровня тревожности проведена в тесте «открытое поле» в соответствии со стандартным протоколом [1]. Установка «открытое поле» для мышей представляет собой камеру размером 40–40–20 см. Пол камеры разделён равномерно линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 2 см.

У каждой мыши индивидуально в течение 2 мин регистрировали горизонтальную и вертикальную активности и п обследованных отверстий в полу. Об уровне тревожности судили по уменьшению K_{OIP} , вычисленному при суммировании указанных выше параметров. Для мышей Balb/c среднее значение K_{OIP} = 20–30.

Статистическая обработка данных проведена с использованием средних значений с ошибкой стандартного отклонения. Достоверность отличий между группами определяли методом дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием программы «Биостат», версия 4.03.

Результаты

Впервые показано (см. рис.), что индометацин в дозе 10 мг/кг вызывает двукратное уменьшение параметров ориентировочно-исследовательских реакций у мышей-самцов Balb/c, о чём свидетельствует достоверное уменьшение K_{OIP} : $10,86 \pm 2,27$ против $20,38 \pm 2,43$ в отрицательном контроле ($p < 0,01$). Относительно высокий исходный уровень тревожности и ответ на индометацин характеризует мышей-самцов Balb/c, как высокочувствительную модель для изучения влияния нейростероидной системы на ГАМК_A рецепторы [2; 4; 14]. Диазепам один вызывал двукратное увеличение параметров ориентировочно-исследовательской активности, о чём свидетельствует достоверное увеличение K_{OIP} : $39,38 \pm 3,4$ против $20,38 \pm 2,43$ в отрицательном контроле ($p < 0,01$), что согласуется с данными литературы [14]. Введённый через 30 мин после индуцирующей тревожный синдром дозы индометацина диазепам стимулирует ориентировочно-исследовательскую активность на характерном достоверно высоком уровне, о чём свидетельствует динамика K_{OIP} : $44,83 \pm 6,74$ против $39,38 \pm 3,4$ (в положительном контроле диазепама); $44,83 \pm 6,74$ против $10,86 \pm 2,2$ (в положительном контроле индометацина) ($p < 0,01$). Это свидетельствует о независимости механизма противотревожного действия классических анксиолитиков от уровня эндогенных нейростероидов. Полученные данные рекомендуют при назначении индометацина по прямым показаниям учитывать гормональный фон пациента, особенно при наличии тревожных реакций, депрессии и посттравма-

тических состояний. Изучение особенностей противотревожного действия анксиолитиков разного типа (классических, селективных, атипичных) на фоне действия агентов, влияющих на синтез эндогенных нейростероидов, является актуальным вопросом дальнейшего экспериментального анализа.

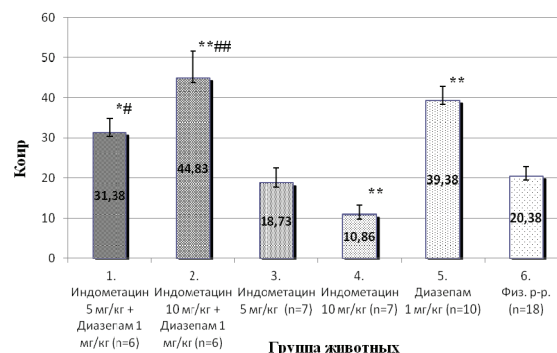


Рис. Влияние индометацина и/или диазепама на величину ориентировочно-исследовательских реакций (K_{OIP}) у мышей-самцов Balb/c в «открытом поле»:

* $p \leq 0,05$ в сравнении с физиологическим раствором;
 # $p \leq 0,05$ в сравнении с индометацином;
 ** $p \leq 0,01$ в сравнении с физиологическим раствором;
 ## $p \leq 0,01$ в сравнении с индометацином.

Выводы

1. Индометацин в дозе 10 мг/кг при однократном внутривнутреннем введении вызывает достоверное двукратное снижение ориентировочно-исследовательских реакций у самцов мышей Balb/c.
2. Диазепам в дозе 1 мг/кг при однократном внутривнутреннем введении проявляет анксиолитическое действие, увеличивая в 2 раза коэффициент ориентировочно-исследовательских реакций у мышей-самцов Balb/c.
3. Диазепам, введённый после индометацина в дозе, индуцирующей уменьшение ориентировочно-исследовательских реакций, приводит к предупреждению тревожного состояния у мышей-самцов Balb/c.

Литература

1. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ. – В кн.: Руководство... – М.: «ИИИ «Ремедиум», 2000. – С. 126–30.
2. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г. и др. Фармакогенетическая концепция... // Вестник РАМН. – 1998. – № 11. – С. 3–9.
3. Almaghour H.G., Sherif F.M. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on behavioral actions of diazepam in mice // Neurosciences (Riyadh). – 2010. – 2. – P. 84–9.
4. Belzung C., Berto F. Further pharmacological validation of the Balb/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety // Behav. Pharmacol. – 1997. – 8. – P. 541–8.
5. Clunie M., Crone L.-A. et al. Psychiatric side effects of indomethacin in parturients // Can. J. of Anest. – 2003. – 6. – P. 586–8.
6. Frye C.A., Edinger L.E. Testosterone's metabolism... // Pharmacol Biochem Behav. – 2004. – 3. – P. 473–81.
7. Frye C.A., Paris J.J., Rhodes M.E. Exploratory, anti-anxiety, social, and sexual behaviors of rats in behavioral estrus is attenuated with inhibition of 36,56-THP formation in the midbrain ventral tegmental area // Behav Brain Res. – 2008. – 2. – P. 269–76.
8. Frye C.A., Paris J.J. Progesterone turnover to its 5- α -reduced metabolites in the ventral tegmental area of the midbrain is essential for initiating social and affective behavior and progesterone metabolism in female rats // Journal of endocrinological investigation. – 2011. – 7. – P. 188–99.
9. Griffin L.D., Mellon S.H. Biosynthesis of the neurosteroid 3{ α }-hydroxy-4-pregnen-20-one (3{ α }HP), a specific inhibitor of FSH release // Endocrinology. – 2001. – 11. – P. 4617–4622.
10. Hoppman R.A., Peden J.G., Ober S.K. Central nervous system side effects of nonsteroid anti-inflammatory drugs // Arch Intern Med. – 1991. – 151. – P. 1309–13.
11. Kita A., Furukawa K. Involvement of neurosteroids in the anxiolytic-like effects of AC-5216 in mice // Pharm Biochem Behav. – 2008. – 89. – P. 171–8.
12. Liu X., Lee T.L., Wong P.T.-H. Cyclooxygenase-1 inhibition shortens the duration of diazepam-induced loss of righting reflex in mice // Anesth Analg. – 2006. – 102. – P. 135–40.
13. Reddy D.S., Rogawski M.A. Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABAA receptor function and seizure susceptibility // The Journal of Neuroscience. – 2002. – 9. – P. 3795–805.
14. Seredenin S.B., Iarkova M.A., Voronin M.V. 3H-Diazepam binding in the brain of intact animals with various reactivity to emotional stress // Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya. – 2001. – 1. – P. 63–5.
15. Tsutsui K. Minireview: Progesterone biosynthesis and action in the developing neuron // Endocrinology. – 2008. – 6. – P. 2757–61.
16. Ugale R.R., Sharma A.N., Kokare D.M. et al. Neurosteroid allopregnanolone mediates anxiolytic effect of etifoxine in rats // Brain Research. – 2007. – 12. – P. 193–201.

УДК 612.017.3:616.37

*И.В. Манина^{1,2}, А.М. Рыжик², Л.И. Стась², Е.Н. Долгина², И.Е. Слостушенская²,
В.Р. Тринько², П.Ф. Азизов², А.Ю. Сергеев^{1,2}, А.В. Караулов¹*

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С IgE-ЗАВИСИМЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ НА ФОНЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

¹Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.Н. Сеченова, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Москва

²Институт Аллергологии и Клинической Иммунологии, Москва

Контактная информация

Ирина Владимировна Манина, кандидат медицинских наук, врач аллерголог-иммунолог

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

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

Статья поступила 12.01.2012, подписана в печать 18.01.2012.

Резюме

Проведен анализ показателей иммунной системы на фоне сублингвальной и инъекционной СИТ у пациентов с IgE-зависимым типом заболевания в течение 5 лет динамического наблюдения. Обследовано 417 человек обоего пола, средний возраст 24,3±9,8 лет. Показано, что до начала СИТ у пациентов более чем в 2 раза увеличены показатели ЦИК и общего IgE в крови, которые существенно снижаются после проведения лечения. Уровень общего IgG исходно увеличен преимущественно за счет IgG1 и IgG4 подклассов, после СИТ отмечена тенденция к увеличению IgG4. Количество CD71⁺ лимфоцитов до начала терапии увеличено до 13,3±3,3 %, а после курса СИТ нормализуется. Количество CD25⁺ клеток исходно увеличено до 16,9±3,0 %, а после проведения лечения отмечена последующая тенденция к увеличению. Эффективность лечения IgE-зависимых заболеваний методом СИТ связана с происходящими иммуномоделирующими процессами, и достигает 90 %-ной результативности после полного курса лечения.

Ключевые слова: специфическая иммунотерапия (СИТ), сублингвальные аллергены, инъекционные аллергены, поллиноз, бронхиальная астма.

*I.V. Manina^{1,2}, A.M. Ryzhikh², L.I. Stas², E.N. Dolgina², I.E. Slastushenskaya²,
V.R. Trinko², P.F. Azizov², A.Yu. Sergeev^{1,2}, A.V. Karaulov¹*

DYNAMIC OF IMMUNE SYSTEM PARAMETERS FOR PATIENTS WITH IgE-DEPENDENT DISEASES USED THE SPECIFIC IMMUNOTHERAPY

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

²Institute of Allergology and Clinical Immunology, Moscow

Abstract

We investigated immune system parameters for patients with IgE-dependent diseases treated by sublingual and injection SIT within 5 years. We surveyed 417 men and women, middle age 24,3±9,8 лет. It is shown that level of the CIC and the general IgE in blood before SIT was above in 2 times and it essentially decrease after SIT. Level of the general IgG has been enlarged at the expense of IgG1 and IgG4 subclasses at first before SIT, level IgG4 was enlarged after SIT. Level CD71⁺ lymphocytes it has been enlarged to 13,3±3,3 %, it was normalized after SIT. Level CD25⁺ lymphocytes it is enlarged to 16,9±3,0 % before SIT, and it was enlarged after SIT. Success of treatment IgE- dependent diseases results from immuno-modeling processes using SIT. Efficiency reaches 90 % after complete course of treatment.

Key words: specific immunotherapy (SIT), sublingual allergen, injection allergen, pollinosis, bronchial asthma.

Введение

Метод СИТ показан при IgE-зависимых аллергических заболеваниях. Этиопатогенез аллергических заболеваний связан с образованием в организме специфических IgE в ответ на определенный антиген (аллерген). В случае поступления во внутреннюю среду организма аллергена последний фрагментируется в антиген-представляющих клетках до пептидов, которые затем представляются Th2-лимфоцитами. Th2-клеточный ответ характеризуется продукцией клетками интерлейкинов: IL-4, IL-13 и IL-5 [8; 12; 16].

Образовавшиеся IgE фиксируются на высокоаффинных рецепторах Fc-фрагмента иммуноглобулина E – Fc(RI), расположенных на тучных клетках слизистых оболочек и соединительной ткани. При повторном поступлении аллерген связывается IgE-

антителами, происходит активация тучных клеток, в результате чего из них секретируются медиаторы (гистамин, простагландин D2, лейкотриены C4, D4, E4), фактор активации тромбоцитов – FАТ (триптаза и др.), которые вызывают повышение сосудистой проницаемости и отек ткани, сокращение гладкой мускулатуры, гиперсекрецию слизистых желез, раздражение периферических нервных окончаний. Эти изменения составляют основу быстрой (ранней) фазы аллергической реакции, развивающейся в течение первых минут после действия аллергена. Помимо указанных действий, высвобожденные медиаторы привлекают в зону аллергической реакции базофилы, эозинофилы, моноциты, лимфоциты, нейтрофилы, секретирующие провоспалительные медиаторы. Действие этих клеток и их медиаторов формирует позднюю (или отсроченную) фазу аллергической реакции [6; 11; 18].

Целью СИТ является снижение чувствительности пациента к естественной экспозиции данного аллергена – специфическая гипосенсибилизация [2; 5].

Механизмы действия СИТ весьма сложны и продолжают уточняться [13; 14; 15].

В результате СИТ происходит смена Th2-клеточного ответа на Th1-клеточный ответ и генерация продукции IL-2 и TGF- β Treg-клетками. Th1-клеточный ответ, стимулируя выработку IFN- γ , ингибирует Th2-клеточные реакции. Между Th1- и Th2-клетками существуют реципрокные отношения, и IFN- γ угнетает активность Th2-клеток, необходимых для осуществления IgE-ответа [5; 7; 19].

Регуляторные цитокины IL-10 и TGF- β вызывают изменение В-лимфоцитарных реакций на синтез антител классов IgG4 и IgA и подавляют выработку IgE-антител. К тому же, цитокины IL-10 и TGF- β прямо или косвенно подавляют эффекторные клетки аллергического воспаления: уменьшается содержание тучных клеток, угнетается накопление клеток воспаления (эозинофилов и нейтрофилов), что, в свою очередь, приводит к угнетению накопления в тканях организма большого медиаторов воспаления, высвобождаемых из этих клеток, к уменьшению секреции хемотаксических посредников, инициирующих позднюю фазу аллергического воспаления и неспецифическую тканевую реактивность [7; 10; 18]. Возникающее при СИТ угнетение признаков аллергического воспаления может сохраняться на протяжении длительного (до 15–30 лет) времени [17; 18].

Целью нашей работы явилась оценка параметров иммунной системы на фоне СИТ неинфекционными аллергенами у больных с IgE-зависимым типом заболевания.

Материалы и методы

В исследование включены 417 пациентов 5–60 лет, которым была проведена СИТ врачами аллергологами-иммунологами Института Аллергологии и Клинической Иммунологии (г. Москва) за период с января 2005 по август 2011 года.

Были представлены следующие нозологические формы заболеваний: бронхиальная астма (атопическая форма, легкой и средней степени тяжести), аллергический риноконъюнктивит среднетяжелого и тяжелого течения, atopический дерматит персистирующего течения.

Отбор (по материалам ARIA) пациентов осуществляли в соответствии с международными рекомендациями [2; 3; 5; 6; 8; 9].

Критерии отбора пациентов для проведения СИТ представлены в табл. 1.

Средний возраст пациентов 24,3 $\pm$ 9,8 лет, в т.ч. 336 взрослых от 15 до 60 лет (средний возраст 28,7 $\pm$ 8,7 лет) и 81 ребенок от 5 до 14 лет (средний возраст 11,4 $\pm$ 1,7 лет). Пациентов мужского пола – 242 человека, женского – 175 человек.

Для проведения СИТ использовали препараты производства ФГУП НПО «Микроген» (Россия), «Sevapharma» (Чешская Республика); «Stallergens» (Франция). Ведение препаратов проводили по нарастающей схеме, начиная с минимальной концентрации аллергена, рекомендованной производителем. Увеличение дозы препарата производили, учитывая индивидуальную переносимость.

Выявление спектра сенсибилизации проводилось путем скарификационных и *prick* кожных тестов с респираторными неинфекционными аллергенами (НПО «Микроген», РФ) или количественно-

го определения специфических IgE в сыворотке крови на автоматическом анализаторе ImmunoCAP 100E (Phadia AB, Швеция).

Содержание субпопуляций лимфоцитов в крови проводили с использованием МКА методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FacsCalibur (Becton Dickinson, США).

Использовали FITC панель МКА (производства «Сорбент», ФГУ Институт Иммунологии Минздравсоцразвития РФ) к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD71, CD25, HLA-DR. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) рассчитывали по соотношению CD4⁺/CD8⁺.

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

Исследование уровня интерферона проводили по методу С. С. Григорян [1]. В цельной гепаринизированной крови микрометодом *in vitro* определяли уровень сывороточного интерферона (IFN), а также его спонтанную и индуцированную продукцию лейкоцитами. Продукцию индуцированного IFN- α определяли при стимуляции лейкоцитов ВБН, продукцию IFN- γ лейкоцитами при воздействии митогеном ФГА.

Метаболическую и цитохимическую активность фагоцитов определяли путем спонтанного теста с НСТ (нитросиний тетразолий), методом хемилюминесценции, индуцированную *in vitro* фагоцитозом частиц опсонизированного зимозана (усиленной добавлением люминола, люцигенина) с использованием люциметра L1251 (LKB, Швеция).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов программ Statistica 6.0, Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

На основании анализа полученных данных выявлено, что преобладающее количество пациентов (60 % от общего количества) имели аллергический риноконъюнктивит (поллиноз). Сезонная или круглогодичная бронхиальная астма выявлялась в два раза реже, а явления atopического дерматита отмечены только 5% пациентов, нуждающихся в проведении СИТ. Суммарный стаж заболевания составил от 1 года до 30 лет, средний срок заболевания составил 9,5 $\pm$ 6,9 лет.

По данным аллергообследования в 80% случаев выявлялась поливалентная сенсибилизация. Наибольшее число пациентов, 202 человека (48,5% от общей группы), в качестве основного причинно-значимого аллергена имели таковые пыльники деревьев (береза, ольха, лещина), что связано с особенностями географического положения центрального региона РФ и специфической флорой. Лечение аллергенами пыльники злаковых трав (тимофеевка, овсяница, ежа, мятлик) проведено 63 пациентам (15 % от общей группы), а аллергенами полыни (полынь горькая, полынь обыкновенная) 71 пациенту (17 % от общей группы). Лечение аллергенами клещей домашней пыли проведено 81 пациенту (19,5 % от общей группы). Результаты представлены графически на рис. 1.

До начала лечения СИТ по результатам общих клинических анализов крови, мочи и данных физикального осмотра наличия воспалительного процесса у пациентов не выявлено.

Таблица 1

Показания и противопоказания к проведению СИТ

Критерии включения пациентов для проведения СИТ	Противопоказания к проведению СИТ
пациенты с аллергическим ринитом (риноконъюнктивитом)	тяжелые иммунопатологические состояния и иммунодефициты, а также активно протекающее злокачественное заболевание
пациенты с легкой и среднетяжелой формой бронхиальной астмы, при показателях FEV1 более 70 % от должных величин после адекватной фармакотерапии	наличие в анамнезе анафилактического шока на СИТ
пациенты, у которых симптомы болезни не контролируются в должной степени после элиминации аллергенов или если полноценная элиминация аллергена невозможна	психические расстройства
пациенты, имеющие как бронхиальные, так и риноконъюнктивальные симптомы или дерматит	невозможность соблюдения пациентом схемы назначенного лечения
пациенты, отказывающимся от длительного (постоянного) приема фармакологических препаратов, в том числе по религиозным убеждениям	тяжелая форма бронхиальной астмы, не контролируемая фармакотерапией (FEV1 менее 70 % после проведения адекватной фармакотерапии)
пациенты, у которых фармакотерапия вызывает грубые побочные эффекты.	сердечно-сосудистые заболевания, при которых возможны осложнения при использовании адреналина (эпинефрина) и лечение β-блокаторами, ингибиторами АПФ

Таблица 2

Динамика показателей лейкоцитарной формулы на фоне СИТ

Показатель	Исходные значения	Динамика после курса СИТ	Референтные интервалы
Лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л	$5,5 \pm 1,1$	Без изменений	3,2–11,3
Эозинофилы, %	$2 \pm 1,1$	Без изменений	0,5–5
Палочкоядерные, %	$0,5 \pm 0,1$	Без изменений	0,5–6
Сегментоядерные, %	$51,8 \pm 6,3$	Без изменений	47–72
Лимфоциты, %	$41,1 \pm 6,6$	Без изменений	19–37
Моноциты, %	$4,2 \pm 1,1$	Без изменений	3–11

Таблица 3

Динамика показателей гуморального звена иммунитета на фоне СИТ

Показатель	Исходная концентрация, г/л	Динамика после курса СИТ	Референтные значения, г/л
Ig E общ	$268,7 \pm 173,3^*$	Снижение/нормализация	0–100
Ig A общ	$1,6 \pm 0,2$	Без изменений	1,3–3,1
Ig M общ	$1,1 \pm 0,2$	Без изменений	0,9–1,5
Ig G общ	$15,2 \pm 1,2^*$	Без изменений	8–13
Ig G1 общ	$9,1 \pm 0,8^*$	Без изменений	5,5–9
Ig G2 общ	$4,3 \pm 0,6$	Без изменений	1,8–4,5
Ig G3 общ	$1,2 \pm 0,2$	Без изменений	0,5–1,5
Ig G4 общ	$0,8 \pm 0,3^*$	Тенденция к увеличению	0,2–0,8
ЦИК (у.е.)	$0,34 \pm 0,1^*$	Снижение/нормализация	0–0,12

*выраженные отклонения от нормальных значений

Таблица 4

Динамика показателей иммунограммы на фоне СИТ

Показатель	Исходно		Динамика после курса СИТ	Референтные значения, %
	Абсолютные значения, мм^3	%		
CD 3+	$1332,6 \pm 269,0$	$59,5 \pm 4,5$	Без изменений	55–75
CD 4+	$829,9 \pm 172,6$	$37,1 \pm 2,9$	Без изменений	34–43
CD 8+	$567,0 \pm 115,1$	$25,2 \pm 1,8$	Без изменений	18–28
CD 22+	$382,6 \pm 102,2$	$17,2 \pm 3,1$	Без изменений	14–20
CD 72+	$485,7 \pm 103,3$	$21,8 \pm 1,6$	Без изменений	18–29
CD 16+	$235,2 \pm 53,1$	$10,5 \pm 1,3$	Без изменений	8–12
CD 71+	$289,3 \pm 90,7^*$	$13,3 \pm 3,3^*$	Нормализация	6–12
CD 25+	$372,3 \pm 97,8^*$	$16,9 \pm 3,0^*$	Тенденция к увеличению	8–12

*выраженные отклонения от нормальных значений

Таблица 5

Динамика показателей фагоцитарной активности и интерферонового звена на фоне СИТ

Показатель	Исходные значения	Динамика после курса СИТ	Референтные интервалы
Фагоцитарное число	5,7±1,1	Без изменений	3–8
Фагоцитарный индекс, %	73,4±3,8	Без изменений	60–80
Сывороточный интерферон, МЕ/мл	6,1±1,7	Без изменений	2–8
Индукированный интерферон альфа, МЕ/мл	715±92,3	Без изменений	600–1200
Интерферон альфа, пг/мл	42,1±15,7	Без изменений	20–120
НСТ-тест, %	20,6±4,2	Без изменений	12–21



Рис. 1. Спектр причинно-значимых аллергенов у пациентов, получающих курс СИТ.

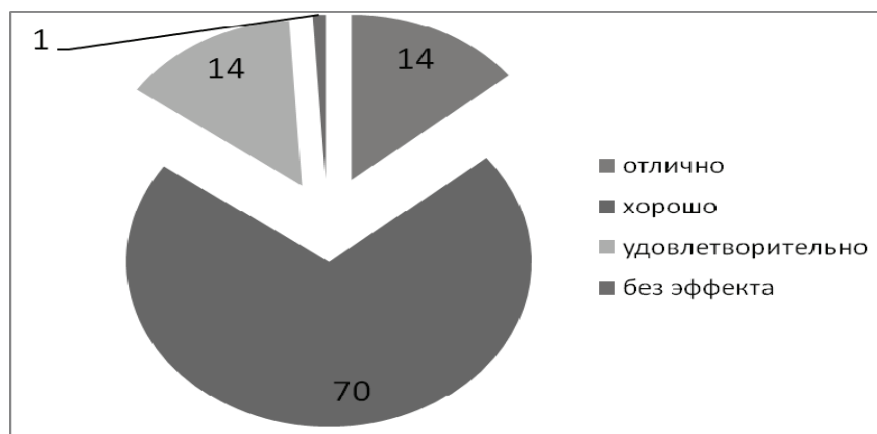


Рис. 2. Эффективность СИТ в %-соотношении после первого курса терапии.

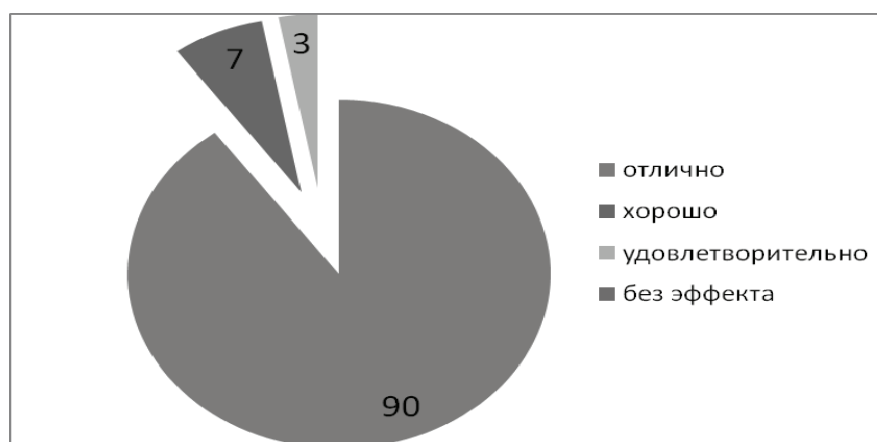


Рис. 3. Эффективность СИТ в %-соотношении после полного курса терапии.

Лейкоцитарная формула не превышала допустимых референтных значений. На фоне СИТ и после курса СИТ показатели лейкограммы не менялись. Результаты представлены на табл. 2.

По данным обследования иммунной системы выявлены существенные сдвиги в системе гуморального звена. У всех пациентов до начала курса СИТ показано достоверное увеличение уровня общего IgE до $268,6 \pm 166,3$ г/л и общего IgG $15,2 \pm 1,2$ г/л, при нормальных значениях общего IgA и общего IgM.

Увеличение общего IgG в сыворотке крови происходило за счет увеличения подклассов IgG1 и IgG4. После курса СИТ показатели общего IgA, общего IgM не менялись, отмечена нормализация уровня общего IgE.

Уровень общего IgG оставался на прежнем уровне с тенденцией к увеличению уровня IgG4, распределение по подклассам существенно не изменилось. Данные представлены в табл. 3.

Количество циркулирующих иммунных комплексов до начала СИТ превышало референтные значения в два раза и составило $0,34 \pm 0,11$ у.е., что свидетельствует об одновременном присутствии высоких концентраций антигенов и их специфических антител в крови. Формирование циркулирующих иммунных комплексов является физиологическим механизмом защиты, следствием которых является быстрое устранение как эндогенных, так и экзогенных антигенов (аллергенов, вирусов, антигенов микроорганизмов, паразитов и прочее) посредством ретикуло-эндотелиальной системы. ЦИК обладают способностью связывать и активировать комплемент, что ведёт к повреждению тканей. Помимо IgE-зависимых заболеваний повышение уровня ЦИК может наблюдаться при аутоиммунных заболеваниях, хронических инфекционных заболеваниях, при которых постоянная продукция антигена инфекционным агентом сочетается с иммунным ответом на него. После курса СИТ уровень ЦИК значительно снизился, в большинстве случаев достигнута нормализация.

В системе клеточного звена обнаружены следующие изменения. Результаты иммунологического обследования пациентов представлены в табл. 4 и табл. 5. Выявлено повышение количества клеток, экспрессирующих ранние дифференцировочные активационные поверхностные антигены (CD25, CD71). Отмечено значительное увеличение экспрессии альфа-цепи рецептора IL-2 (CD25⁺) до $372,3 \pm 97,8$ кл/мм³ ($16,9 \pm 3,1$ %). CD25⁺ экспрессирован на активированных Т- и В-клетках и на активированных макрофагах.

Рецептор трансферина (CD71⁺), опосредующий поступление железа в клетку, у пациентов с аллергическими заболеваниями был увеличен до $289,3 \pm 90,1$ кл/мм³ ($13,3 \pm 3,3$ %). Этот показатель обнаруживается в делящихся клетках, отражает способность клеток к пролиферации и дифференцировке и характеризует их функциональное состояние. После курса СИТ у большинства пациентов отмечена нормализация уровня CD71⁺.

Дефицита Т-клеточного и В-клеточного звеньев у пациентов с IgE-зависимыми заболеваниями не выявлено. Содержание Т-лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺ Т-хелперов, цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов (CD22⁺ и CD72⁺) до начала СИТ было в пределах нормальных значений. Иммунорегуляторный индекс (CD4⁺/CD8⁺) не нарушен и составил $1,7 \pm 0,2$ при референтном ин-

тервале 1,5–2,5 у.е. После курса СИТ данные показатели Т- и В-клеточного звеньев не изменились.

Исходный уровень NK-клеток (CD16⁺) до и после курса СИТ был в пределах нормы. Система интерферонов до и после СИТ сохранялась в пределах референтных значений.

Фагоцитарное число и активность гранулоцитарных клеток крови у пациентов с IgE-зависимыми заболеваниями до начала СИТ была в пределах нормы и не менялась после курса СИТ. Окислительно-восстановительный потенциал нейтрофилов в НСТ-тесте сохранялся на уровне верхней границы нормы, что свидетельствует о повышенной активности гранулоцитов. Активность миелопероксидазы, эстеразы и фосфатазы до и после курса СИТ оставались в пределах нормы.

На основании субъективных и объективных параметров у пациентов с IgE-зависимыми заболеваниями фоне проведения СИТ отмечен иммунный ответ, который выражался в виде местных реакции по типу инфильтрата и гиперемии в месте подкожного введения лечебной смеси аллергена. Данная реакция развивалась через 12–24 ч после инъекции, и вероятнее всего, свидетельствовал об иммунной реакции по типу гиперчувствительности замедленного типа. Отмечено, что наличие подобных постинъекционных реакций чаще встречалось в период инициирующей фазы курса и уменьшалось в период поддерживающей фазы СИТ. По данным многих авторов установлена корреляция между выраженностью показателей иммунных реакций в периферической крови и реакцией со стороны кожных покровов. Согласно представлениям современных исследователей, основными участниками иммунных реакций в коже являются клетки лимфоидного ряда, макрофаги, эозинофилы [4].

В период проведения СИТ в некоторых случаях были отмечены постинъекционные реакции (купированы приемом симптоматических средств и не требовали прекращения курса лечения). Местные реакции (не более 20% наблюдения во всех группах за весь период наблюдения) выявлены у пациентов, имевших по результатам иммунологического обследования максимально высокий уровень сенсибилизации. Системные реакции развивались редко, были отмечены у пациентов, не соблюдавших гипоаллергенные мероприятия: острая крапивница – 2 случая за весь период наблюдения, риноконъюнктивальный синдром – 7 случаев. Бронхообструктивный синдром и анафилактическая реакция – не зарегистрированы.

Пациенты прекращали СИТ, достигая очень хороших и отличных результатов лечения, выражающихся в ремиссии заболевания (отсутствии клинических симптомов при контакте и длительном нахождении в присутствии аллергена в течение нескольких лет). Результаты клинической эффективности СИТ на основании опроса пациентов и результатов иммунологического обследования по результатам первого года и полного курса терапии представлены графически на рис. 2 и рис. 3. Эффективность терапии после первого года лечения составила 70 % хороших результатов и 14 % отличных, а после завершения полного курса достигала 90 % отличных результатов.

Заключение

По результатам иммунного обследования у пациентов с IgE-зависимыми заболеваниями более чем в 2 раза увеличены показатели ЦИК и IgE, которые существенно снижаются после проведения СИТ.

Уровень общего IgG исходно увеличен преимущественно за счет IgG1 и IgG4 подклассов, на фоне СИТ отмечена тенденция к увеличению IgG4. Количество CD71⁺ лимфоцитов до начала СИТ увеличено до 13,3±3,3 %, а после курса СИТ нормализуется.

Количество CD25⁺ клеток исходно увеличено до 16,9±3,0 %, а после проведения лечения отмечена последующая тенденция к увеличению.

Вероятность развития местных реакций чаще у пациентов с высокой степенью сенсibilизации и снижается после формирования толерантности к аллергену. Эффективность лечения IgE-зависимых заболеваний методом СИТ связана с происходящими иммуномоделирующими процессами, и достигает 90 %-ной результативности после полного курса лечения.

Исследования выполнены при поддержке Совета по грантам Президента РФ (НШ-757.2012.7).

Литература

1. Григорян С.С., Еришов Ф.И. Методические принципы определения интерферонового статуса. – Система интерферонов в норме и патологии. – М., 1996. – С. 147–55
2. Лусс Л.В., Арипова Т.У., Ильина Н.И., Лысикова И.В. Распространенность симптомов бронхиальной астмы (результаты программы ISAAC) // Астма. – 2000. – 1(1). – С. 52–9.
3. Отчет по конференции: Аллергический Ринит и его влияние на Астму (ARIA) // J Allergy Clin Immunol. – 2001. – 108. – Р. 147–336.
4. Сергеев А.Ю., Караулов А.В., Сергеев Ю.В. Иммунодерматология: иммунологические основы патогенеза воспалительных дерматозов человека // Иммунопатология, аллергология и инфектология. – 2003. – 3. – С. 10–23.
5. Blaser K. Immunological principles of allergen-specific immune therapy // HNO. – 2008. – 56(8). – Р. 759–63.
6. Bot C.M., Moed H., Berger M.Y. et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy in children with house dust mite allergy in primary care: study design and recruitment // BMC Fam Pract. – 2008. – 20(9). – Р. 59.
7. Calderon M.A., Penagos M., Sheikh A. Sublingual immunotherapy for allergic conjunctivitis: Cochrane systematic review and meta-analysis // Clin Exp Allergy. – 2011. – 41(9). – Р. 1263–72.
8. Cox L., Esch R.E., Corbett M. et al. Allergen immunotherapy practice in the United States: guidelines, measures, and outcomes // Ann Allergy Asthma Immunol. – 2011. – 107(4). – Р. 289–99.
9. Didier A., Worm M., Horak F. et al. Sustained 3-year efficacy of pre- and coseasonal 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in patients with grass pollen-induced rhinoconjunctivitis // J Allergy Clin Immunol. – 2011. – 128(3). – Р. 559–66.
10. Durham S.R. Sustained effects of grass pollen AIT // Allergy. – 2011. – 66(Suppl 95). – Р. 50–2.
11. Durham S.R. Allergen immunotherapy: 100 years on // Clin Exp Allergy. – 2011. – 41(9). – Р. 1171.
12. Hong J., Bielory L. Oralair®: sublingual immunotherapy for the treatment of grass pollen allergic rhinoconjunctivitis // Expert Rev Clin Immunol. – 2011. – 7(4). – Р. 437–44.
13. Ishii Y. Allergen-specific immunotherapy utilizing mechanisms for immune regulation // Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. – 2008. – 31(5). – Р. 392–8.
14. Ring J., Guterthum J. 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy (ASIT) // Allergy. – 2011. – 66(6). – Р. 713–24.
15. Savolainen J., Alenius H., Renkonen R. Mechanisms and new innovations in hyposensitization // Duodecim. – 2011. – 127(12). – Р. 1289–95.
16. Walker S.M., Durham S.R., Till S.J. Immunotherapy for allergic rhinitis // Clin Exp Allergy. – 2011. – 41(9). – Р. 1177–200.
17. White P., Smith H., Baker N. et al. Symptom control in patients with hay fever in UK general practice: how well are we doing and is there a need for allergen immunotherapy? // Clin Exp Allergy. – 1998. – 28(3). – Р. 266–70.
18. Woody J., Wise S.K., Koepp S., Schlosser R.J. Clinical improvement after escalation for sublingual immunotherapy (SLIT) // Ear Nose Throat J. – 2011. – 90(9). – Р. 16–22.
19. Yousef Taher A., Henricks P.A., van Oosterhout A.J. Allergen-specific subcutaneous immunotherapy in allergic asthma: immunologic mechanisms and improvement // Libyan J Med. – 2010. – 21(5). – Р. 5303.

УДК 615.37:612.017.1

В.В. Плетнев, Б.В. Пинегин, Т.Б. Мастернак, С.И. Елкина, М.Ф. Никонова, Т.Ю. Харченко

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКАРТЕНА

ГНЦ РФ Институт иммунологии, Москва

Контактная информация

Плетнев Владимир Владимирович, клинический интерн кафедры онкологии ФПДО МГМСУ

Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2; тел. +7(495)324-16-44

e-mail: shifa@list.ru

Статья поступила 28.11.2011, подписана в печать 18.01.2012.

Резюме

Цель настоящей работы – изучение иммуномодулирующей активности селекартена (СК) *in vivo* и *in vitro*. Изучение влияния СК на устойчивость к стафилококковой инфекции проведено на 48 мышах линии (CBAxBL)F₁, зараженных летальной дозой *St. pyogenes*. Для постановки реакции внутриклеточного киллинга использован *St. aureus*, меченный флюоресцеина изотиоцианатом. Влияние СК на гуморальный иммунный ответ оценивали по накоплению антителообразующих клеток в селезенках мышей по методу Каннингема. Показателем клеточного иммунного ответа послужила реакция гиперчувствительности замедленного типа. Хемилюминесценцию измеряли при помощи хемилюминометра LUCY 1 (Австрия). Изучение влияния СК на продукцию фактора некроза опухолей-α мононуклеарными клетками периферической крови человека выполнено при помощи метода твердофазного иммуноферментного анализа. Таким образом, СК обладает иммуномодулирующим действием.

Ключевые слова: селекартен, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, мононуклеарные клетки.

V.V. Pletnev, B.V. Pinegin, T.B. Masternak, S.I. Elkina, M.F. Nikonova, T.Y. Harchenko

STUDYING OF IMMUNOMODULATING ACTION OF SELECARTEN

State Scientific Center, Immunology Institute, Moscow

Abstract

The purpose of the present work was studying of immunomodulating activity of Selecarten. Studying of influence of Selecarten on stability to Staphylococcus infection is spent on 48 mice infected with a lethal dose of Staphylococcus pyogenes. For statement of reaction endocellular killing it is used Staphylococcus marked with fluorescein-isothiocyanate. Influence of Selecarten on the humoral immune answer estimated on accumulation of antibodyforming cells in spleens of mice on Cunningham's method. Reaction of hypersensitivity of the slowed down type has served as indicator of the cellular immune answer. Chemiluminescence measured with the help of chemiluminometer. Studying of influence of Selecarten on production of tumor necrosis factor-α by mononuclear cells of peripheral blood of the person is executed by means of a method of hardphase immunoferment analysis. Thus, Selecarten possesses immunomodulating action.

Key words: Selecarten, humoral immunity, cellular immunity, mononuclear cells.

Введение

Характерной чертой начала XXI века является существенный рост острых и хронических инфекционных заболеваний бактериальной, грибковой, протозойной и вирусной природы. Возвращаются заболевания, которые были частыми в XIX веке и почти исчезли в XX, например туберкулез, малярия, дифтерия и др., и появляются новые инфекционные процессы, например ВИЧ-инфекция. Наблюдается рост инфекционно-воспалительных заболеваний различной этиологии и локализации. Этиологическим фактором часто являются условно-патогенные или оппортунистические микробы, обладающие множественной устойчивостью к антибиотикам, с атипичными биологическими свойствами. Это является следствием снижения иммунологической реактивности всего населения планеты. На фоне снижения функций иммунной системы применение даже высокоэффективных антибиотиков последнего поколения не всегда дает хороший клинический эффект.

Важнейшей проблемой современной медицины является коррекция функций иммунной системы с помощью иммуномодулирующих средств.

Поэтому проблема создания новых высокоэффективных лекарственных препаратов, обладающих иммуномодулирующим действием, является одной из основных научно-теоретических и научно-практических задач современной медицины. В настоящее время привлекает внимание исследователей роль микроэлементов и витаминов в нормальном функционировании иммунной системы. Установлено, что такие вещества как витамин А, бета-каротин, фолиевая кислота, витамин В₁₂, витамин С, рибофлавин, железо, цинк и селен, обладают иммуномодулирующими свойствами и их недостаточность ведет к снижению иммунореактивности населения и повышению инфекционной заболеваемости [3; 4]. Многие из перечисленных веществ обладают выраженными антиоксидантными свойствами, что очень важно при лечении многих тяжелых заболеваний человека (рак, атеросклероз, преждевременное старение, аутоиммунные страдания и др.). К таким веществам с иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами относится микроэлемент селен и его производные. Селеносодержащие вещества повышают иммунологическую реактивность, следствием чего является снижение инфекционной заболеваемости [8; 9].

При дефиците селена малопатогенный вирус Коксаки становится вирулентным и вызывает серьезные нарушения в работе сердца, вирус гриппа вызывает более тяжелые повреждения легочной ткани и у инфицированных людей начинается быстрое прогрессирование ВИЧ-инфекции [10]. Регулярное потребление селеносодержащих продуктов замедляет старение организма и снижает риск развития злокачественных заболеваний [9; 12; 13].

В настоящее время активно разрабатываются лекарственные средства, биологически активные добавки, содержащие селен – незаменимый микроэлемент, обладающий целым рядом свойств и известный своей высокой антиоксидантной активностью [5; 7; 11].

Важным является создание новых комплексных лекарственных препаратов, усиливающих положительное действие селена, и в то же время исключающих возможные отрицательные эффекты микроэлемента, поскольку установлено, что селен в больших дозах токсичен для организма [1].

Учитывая вышесказанное, важным является изучение полезных для организма человека свойств новой формы препарата, содержащего селен, – комплексного растительного препарата «селекартен» (СК). В эксперименте на кроликах с острой ишемией сетчатки, вызванной лазерной коагуляцией (Патент РФ на изобретение № 2313312 на «Способ моделирования ишемии сетчатки глаза» от 27.12.2007) Швецовой Н.Е. (2008) было показано, что СК обладает антиоксидантным, ангиопротекторным, нейропротекторным и ретинопротекторным действием. Под влиянием СК происходит усиление компенсаторных механизмов, направленных на восстановление кровообращения в поврежденных тканях при ишемии и дистрофии сетчатки.

Тем не менее, иммунотропное действие СК не изучалось, а многообразие функций препарата делает актуальным исследование эффективности его применения в клинической иммунологии и в лечении внутренних и инфекционных заболеваний.

Материалы и методы

Исследование иммунотропного действия СК выполняли в соответствии с Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ от 2005 г. [2].

Изучение влияния различных доз СК на устойчивость к стафилококковой инфекции у животных проведено на 48 мышах линии (CBA×BL)F1.

После введения СК мышам заражали летальной дозой (10^{10} клеток/мышь) *St. pyogenes* (штамм Wood-46). Проводили учет количества выживших мышей.

Изучение влияния различных доз СК на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата животных проведено на 48 мышах линии (CBA×BL)F1. Для постановки реакции внутриклеточного киллинга был использован *St. aureus*, меченный флюоресцеином изотиоцианатом.

90 мкл клеток перитонеального экссудата смешивали с 90 мкл живых флюоресцеином изотиоцианат-меченых бактерий 10^6 млн/мл. Смесь инкубировали 20 мин при 37 °С, макрофаги осаждали центрифугированием при 200 г 1 мин при +4 °С и 2 раза отмывали фосфатно-солевым буфером (200 мкл на лунку) от несвязавшихся бактерий. Макрофаги ресуспендировали фосфатно-солевым буфером и инкубировали еще 2,5 ч при 37 °С. Затем клетки осаждали 200 г 1 мин при +4 °С и разруша-

ли 200 мкл 0,2 %-ного сапониона на 0,01М карбонатно-бикарбонатном буфере с pH 9,5 в течение 5 мин. Высвободившиеся бактерии осаждали при угловой скорости 2000 г 10 мин.

Для разделения живого стафилококка от убитого в пробы добавляли иодид пропидиума (PI, Sigma, 2,5 мкг/мл), который окрашивал только мертвые клетки, и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. На DotPlot по параметрам переднего (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния выделяли облако стафилококка и анализировали флюоресценцию на каналах FL1(535 нм) и FL3 (585 нм). Оценивали процент клеток с двойной меткой (погибший стафилококк) по отношению к общему числу клеток.

Изучение влияния различных доз СК на накопление антителобразующих клеток и реакцию ГЗТ у животных проведено на 40 мышах линии (CBA×BL)F1. Были исследованы следующие дозы СК: 1; 10 и 100 мкг/кг. СК вводили за 3 ч до внутрибрюшинной иммунизации субоптимальной дозой эритроцитов барана (3×10^7 клеток на мышь). Влияние СК на гуморальный иммунный ответ оценивали по накоплению АОК в селезенках мышей на 4-е сутки по методу Каннингема.

Лимфоидные клетки от иммунизированных мышей смешивали с эритроцитами и комплементом, инкубировали в виде монослоя в замкнутой камере в течение ночи.

В присутствии комплемента вокруг каждой АОК возникали зоны гемолиза, которые подсчитывали при помощи световой лупы.

Реакцию характеризовали числом АОК на селезенку или на 1 млн ядросодержащих клеток. Показателем клеточного иммунного ответа послужила реакция ГЗТ. Животных иммунизировали внутрибрюшинно эритроцитами барана в дозе 10^8 клеток на мышь. На 6-й день после сенсibilизации животным субплантарно вводили в левую заднюю лапу 10^8 эритроцитов барана, а в подушечку контрлатеральной лапы («контрольная лапа») – физиологический раствор.

Через 24 ч после разрешающей инъекции измеряли толщину опытной и контрольной лапки штангенциркулем. Рассчитали индекс ГЗТ – отношение толщины опытной лапки к контрольной.

Изучение влияния различных доз СК на люминесценцию нейтрофилов человека выполнено на образцах венозной крови здоровых добровольцев. Забор крови производили утром натощак из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом, в качестве которого применяли гепарин в концентрации 10 Ед/мл. Исследовали 6 здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 35 лет. Хемилуминесценцию измеряли при помощи хемилуминометра LUCY 1 (Австрия).

Изучение влияния различных доз селекартена на продукцию ФНО-α мононуклеарными клетками периферической крови человека выполнено на образцах венозной крови здоровых добровольцев. Забор крови производили утром натощак из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом, в качестве которого применяли гепарин в концентрации 10 Ед/мл. Исследовано 5 здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 35 лет. Концентрацию цитокинов в супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов ФНО-α-иммуноферментный анализ «Прокон» (Санкт-Петербург) в соответствии с прилагающимися к ним протоколами.

Результаты и их обсуждение**Влияние различных доз СК на устойчивость к стафилококковой инфекции у мышей**

Результаты представлены в табл. 1. Все исследованные дозы СК повышали устойчивость мышей к стафилококковой инфекции. Однако максимальный эффект отмечен при использовании 1 мкг/кг.

Таким образом, СК в дозах 1; 10 и 100 мкг/кг повышает устойчивость мышей к смертельной стафилококковой инфекции. Оптимальной защищающей дозой СК является 1 мкг/кг.

Влияние различных доз СК на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышей

Результаты исследования бактерицидной активности клеток перитонеального экссудата мышей представлены в табл. 2. Бактерицидная активность была изменена под действием СК. Дозы 1 и 10 мкг/кг СК достоверно повышали способность клеток убивать *St. aureus* на 44 и 69 % соответственно. Доза СК 100 мкг/кг подавляла бактерицидность на 25 %.

Таким образом, СК в дозах 1 и 10 мкг/кг стимулирует бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышей на 44 и 69 % соответственно, а доза 100 мкг/кг снижает этот показатель на 25 %.

Влияние различных доз СК на накопление антителобразующих клеток и реакцию ГЧЗТ у мышей

Результаты оценки влияния СК на гуморальный иммунный ответ представлены в табл. 3, из которой следует, что СК в дозах 100 и 10 мкг/кг достоверно повышал число антителобразующих клеток, то есть стимулировал гуморальный иммунный ответ. Усиливающее действие проявлялось при пересчете числа антителобразующих клеток как на селезенку, так и на 1 млн кариоцитов селезенки. В дозе 1,0 мкг/кг СК не оказывал подобного действия.

В табл. 4 отражены результаты оценки влияния СК на клеточный иммунный ответ. Из данных, представленных в табл. 4 следует, что СК в дозах 100 и 10 мкг/кг усиливал выраженность реакции ГЧЗТ.

Таким образом, СК, вводимый подкожно в дозах 100 и 10 мкг/кг за 3 ч до иммунизации эритроцитами барана, стимулирует гуморальный тимусзависимый и клеточный иммунные ответы.

Влияние различных доз СК на люминолзависимую и люцигенинзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека

Результаты исследования хемилюминесценции лейкоцитов человека представлены в табл. 5–8. СК в концентрации 100 мкг/мл достоверно подавлял все виды спонтанной и зимозаниндуцированной хемилюминесценции в течение всего периода регистрации.

Таким образом, концентрации СК 1 и 10 мкг/мл при совместной инкубации с лейкоцитами периферической крови человека не оказывают значимого влияния на показатели хемилюминесценции, а СК в концентрации 100 мкг/мл достоверно подавляет люминолзависимую и люцигенинзависимую спонтанную и зимозаниндуцированную хемилюминесценцию лейкоцитов человека.

Влияние различных доз СК на продукцию ФНО-α мононуклеарными клетками периферической крови человека

Результаты представлены в табл. 9. Обследовано 5 здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 35 лет. Доноры проявили индивидуальную чувствительность к СК. Для 2 человек оптимальной стимулирующей концентрацией СК явился 1 мкг/мл, для остальных – 10 мкг/мл.

Таким образом, СК в концентрациях 1 и 10 мкг/мл имеет тенденцию к повышению продукции фактора некроза опухолей-α мононуклеарными клетками периферической крови человека.

Таблица 1

Определение устойчивости мышей линии СВА×BL к стафилококковой инфекции через 24 ч после введения СК

Препарат	Доза препарата, мкг/кг	Количество погибших мышей	Выжившие мыши, %	Продолжительность жизни, сутки	Кратность увеличения продолжительности жизни
Физ. р-р (контрольная группа)	–	10	16,0	1,4	–
СК	1	3	74,9	6,9	4,9
	10	4	66,6	4,8	3,4
	100	6	50	3,2	2,3

Таблица 2

Влияние различных доз СК на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышей, (M±m)

Дозы СК, мкг/кг	Бактерицидная активность, %
0	21,5±3,0
1	31±6,2*
10	36,3±5,9*
100	16,7±3,1*
*p<0,05, достоверные различия по сравнению с контролем (0 мкг/кг)	

Таблица 3

Влияние СК на показатели гуморального иммунного ответа у мышей, ($M \pm m$), где M – среднее значение, m – стандартное значение

Препарат	Доза препарата, мкг/кг	Количество АОК на селезенку	Количество кариоцитов в селезенке, $\times 10^8$	Количество АОК на 10^6 спленоцитов
СК	100	11000 $\pm$ 1068*	1,18 $\pm$ 0,43	93,22 $\pm$ 8,3*
	10	13000 $\pm$ 1138*	1,28 $\pm$ 0,3	101,56 $\pm$ 8,9*
	1	5650 $\pm$ 788	1,48 $\pm$ 0,53	38,17 $\pm$ 5,34
Эритроциты барана (контрольная группа)	10^8 кл/мышь	6000 $\pm$ 1672	1,2 $\pm$ 0,26	50 $\pm$ 13,5

* $p < 0,05$

Таблица 4

Влияние СК на показатели клеточного иммунного ответа у мышей, ($M \pm m$)

Препарат	Доза препарата, мкг/кг	Толщина опытной лапки, мм	Толщина контрольной лапки, мм	Индекс ГЗТ
СК	100	4,0 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,2	2*
	10	3,64 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,23	1,58*
	1	3,3 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,22	1,5
Эритроциты барана (контрольная группа)	0	3,3 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,23	1,5

* $p < 0,05$

Таблица 5

Влияние СК на люминолзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека без стимуляции зимозаном, mV/min ($M \pm m$), где M – среднее значение, m – стандартное значение

Время регистрации ХЛ, мин	Контроль	СК, мкг/мл		
		1	10	100
1	6,98 $\pm$ 3,09	6,80 $\pm$ 4,44	5,80 $\pm$ 0,64	2,22 $\pm$ 1,6*
7	9,42 $\pm$ 4,44	8,57 $\pm$ 5,38	7,83 $\pm$ 4,74	3,1 $\pm$ 1,7*
11	11,32 $\pm$ 5,88	10,2 $\pm$ 6,24	10,0 $\pm$ 5,66	3,8 $\pm$ 1,8*
15	14,32 $\pm$ 5,63	12,3 $\pm$ 7,75	11,5 $\pm$ 6,19	4,3 $\pm$ 1,87*
19	12,83 $\pm$ 5,11	10,97 $\pm$ 7,4	10,28 $\pm$ 5,5	3,7 $\pm$ 2,15*

* $p < 0,05$, достоверные различия по сравнению с контролем (0 мкг/мл)

Таблица 6

Влияние СК на люцигенинзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека без стимуляции зимозаном, mV/min ($M \pm m$), где M – среднее значение, m – стандартное значение

Время регистрации ХЛ, мин	Контроль	СК, мкг/мл		
		1	10	100
1	1,02 $\pm$ 0,66	1,03 $\pm$ 0,71	0,93 $\pm$ 0,63	0,58 $\pm$ 0,1*
7	1,13 $\pm$ 0,76	1,17 $\pm$ 0,84	1,03 $\pm$ 0,68	0,63 $\pm$ 0,14*
11	1,25 $\pm$ 0,82	1,33 $\pm$ 0,92	1,18 $\pm$ 0,84	0,67 $\pm$ 0,19*
15	1,47 $\pm$ 0,92	1,57 $\pm$ 1,17	1,28 $\pm$ 0,86	0,77 $\pm$ 0,23*
19	1,28 $\pm$ 0,91	1,28 $\pm$ 0,06	1,12 $\pm$ 0,71	0,67 $\pm$ 0,2*

* $p < 0,05$, достоверные различия по сравнению с контролем (0 мкг/мл)

Таблица 7

Влияние СК на люминолзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека после стимуляции зимозаном, mV/min ($M \pm m$), где M – среднее значение, m – стандартное значение

Время регистрации ХЛ, мин	Контроль	СК, мкг/мл		
		1	10	100
1	106,2 $\pm$ 33,3	112,8 $\pm$ 35,1	120,8 $\pm$ 41,1	21,3 $\pm$ 12,5*
7	131,3 $\pm$ 41,6	144,5 $\pm$ 46,6	146,3 $\pm$ 40,7	24,0 $\pm$ 12,7*
11	179,5 $\pm$ 50,2	177,2 $\pm$ 42,1	172,2 $\pm$ 47,0	29,7 $\pm$ 14,3*
15	229,3 $\pm$ 53,0	227,2 $\pm$ 72,0	211,2 $\pm$ 68,1	34,6 $\pm$ 17,2*
19	203,3 $\pm$ 43,6	200,5 $\pm$ 45,8	192,7 $\pm$ 64,8	30,5 $\pm$ 13,3*

* $p < 0,05$, достоверные различия по сравнению с контрольной группой (0 мкг/мл)

Таблица 8

Влияние СК на люцигенинзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека после стимуляции зимозаном, mV/min ($M \pm m$), где M – среднее значение, m – стандартное значение

Время регистрации ХЛ, мин	Контроль	СК, мкг/мл		
		1	10	100
1	21,67 $\pm$ 5,82	26,33 $\pm$ 8,4	19,00 $\pm$ 8,9	5,17 $\pm$ 3,5*
7	27,33 $\pm$ 6,8	31,33 $\pm$ 9,5	21,00 $\pm$ 9,4	6,20 $\pm$ 3,5*
11	32,67 $\pm$ 9,5	36,33 $\pm$ 12,4	25,33 $\pm$ 13,35	7,50 $\pm$ 3,45*
15	38,83 $\pm$ 6,88	42,83 $\pm$ 10,4	28,67 $\pm$ 15,0	9,00 $\pm$ 3,2*
19	33,67 $\pm$ 6,0	38,00 $\pm$ 10,0	24,00 $\pm$ 11,37	7,78 $\pm$ 2,8*

* $p < 0,05$, достоверные различия по сравнению с контролем (0 мкг/мл)

Таблица 9

Влияние различных концентраций СК на продукцию ФНО- α мононуклеарными клетками периферической крови человека

№ донора	Концентрация фактора некроза опухолей- α , пг/мл			
	Спонтанная продукция	СК, мкг/мл		
		1	10	100
1	25,53	31,28	34,87	0
2	25,08	55,56	29,48	0
3	21,93	33,08	9,69	0
4	10,24	1,60	43,87	0
5	24,18	18,69	46,57	0
M $\pm$ m	23,8 $\pm$ 8,5	31,8 $\pm$ 29,5	40,4 $\pm$ 24,2	0*

* $p < 0,05$, достоверные различия по сравнению с контролем ($P < 0,05$)

Выводы

Селектарген обладает иммуномодулирующим действием.

In vivo СК повышает устойчивость мышей к смертельной стафилококковой инфекции, стимулирует бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышей, стимулирует

гуморальный тимусзависимый и клеточный иммунные ответы.

In vitro СК подавляет люминолзависимую и люцигенинзависимую спонтанную и зимозаниндуцированную хемилюминесценцию лейкоцитов человека, а также имеет тенденцию к повышению продукции ФНО- α мононуклеарными клетками периферической крови человека.

Литература

1. Манаков А.М. Клиническая картина при остром и хроническом отравлении селеном. – Труды института экспериментальной медицины. – Свердловск, 1968. – 103 с.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ Под общей редакцией член-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-изд. перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005 – 832 с.
3. Bhaskaram P. Micronutrient malnutrition, infection and immunity: an overview // Nutr Rev. – 2002. – 60(5 Pt 2). – P. 40–5.
4. Chandra R.K. Nutrition and the immune system from birth to old age // Eur J Clin Nutr. – 2002. – 56(Suppl 3). – P. 73–6.
5. Dolph L. Hatfield, Marla J., Berry and Vadim N. Gladyshev (Eds) Selenium, Second Edition. Its Molecular Biology and Role in Human Health. – Springer US, 2006.
6. Duchateau J. Immunosenescence and the lung // Rev Mal Respir. – 2003. – 20 (5 Pt 1). – P. 735–41.
7. Gladyshev V.N. Selenium in biology and human health: controversies and perspectives. – In Selenium: its molecular biology and role in human health / D.L. Hatfield et al. – Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass, 2001 – P. 313–7.
8. Huang K., Yang A. Inhibitory effect of selenium on *Cryptosporidium parvum* infection in vitro and in vivo // Biol Trace Elem Res. – 2002. – 90. – P. 261–72.
9. Langkamp-Henken B., Bender B.S., Gardner E.M. Nutritional formula enhanced immune function and reduced days of symptoms of upper respiratory tract infection in seniors // J Am Geriatr Soc. – 2004. – 52. – P. 3–12.
10. Rayman M.P. The argument for increasing selenium intake // Proc Nutr Soc. – 2002. – 61. – P. 203–15.
11. Tappel A., Caldwell K. Acceleration of sulfhydryl oxidations by selenocystine // Abstracts of 1st Internat. Symp. (Oregon State University). – 1966. – P. 345.
12. Wayland M., Gilchrist H.G., Marchant T. Immune function, stress response, and body condition in arctic-breeding common eiders in relation to cadmium, mercury, and selenium concentrations // Environ Res. – 2002. – 90. – P. 47–60.
13. Whanger P.D. Selenium and its relationship to cancer: an update dagger // Br J Nutr. – 2004. – 91. – P. 11–29.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.348-006.6-02:616-092.4

М.А. Замкова, П.Б. Копнин, Н.В. Хромова, Б.П. Копнин

**ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ HSF1
НА РОСТ КЛЕТОК РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* И *IN VIVO***

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

Контактная информация

Мария Анатольевна Замкова, лаборант-исследователь лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24, строение 15; тел. +7(495)324-17-39

e-mail: zamkovam@gmail.com

Статья поступила 26.06.2011, подписана в печать 18.01.2012.

Резюме

Транскрипционный фактор HSF1 (Heat Shock Transcriptional Factor 1) обеспечивает защиту клеток от различных стрессов. Несмотря на то, что роль HSF1 в процессах канцерогенеза изучена довольно плохо, предполагается, что он является перспективной мишенью при противоопухолевой терапии. Для проверки этого предположения было изучено влияние различных модификаций активности HSF1 на скорость роста клеток рака ободочной кишки человека *in vitro* и *in vivo*. Анализ полученных сублиний клеток HCT116 с подавленной экспрессией HSF1 или экспрессирующих конститутивно-активную и доминантно-негативную формы HSF1 показал, что ингибирование транскрипционной активности HSF1 увеличивает, а не снижает скорость роста опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, тогда как активация функции HSF1 приводит к противоположному эффекту. Эти изменения сопровождались соответствующими изменениями в уровне фосфорилирования MAP-киназы Erk, экспрессии HIF-1 α и ангиогенной активности опухолевых клеток. По-видимому, изменения функции HSF1 могут модулировать рост опухолей разными путями, и требуются дальнейшие исследования для оценки возможности применения HSF1 в качестве потенциальной мишени противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: HSF1, HIF-1 α , рак, пролиферация, ангиогенез.

M.A. Zamkova, P.B. Kopnin, N.V. Khromova, B.P. Kopnin

**EFFECT OF CHANGES IN HSF1 FUNCTION
ON GROWTH OF HUMAN CARCINOMA CELLS *IN VITRO* AND *IN VIVO***

FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

Abstract

HSF1 is a transcriptional factor that protects cells from various stresses, but its role in tumorigenesis is poorly understood. Nevertheless it was proposed that HSF1 represents perspective drug target whose inhibition could be used for cancer treatment. To check this idea we studied the influence of various modifications of HSF1 activity on growth of human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Analysis of established HCT116 sublines with down-regulated HSF1 or expressing constitutively-active and dominant-negative HSF1 mutants has shown that inhibition of HSF1 transcriptional activity accelerated rather than decelerated growth of tumor cells both *in vitro* and *in vivo* while activation of HSF1 function caused the opposite effect. These changes were accompanied with corresponding alterations in Erk MAP-kinases phosphorylation, HIF-1 α expression and tumor microvessel density. Evidently changes in HSF1 function can modulate tumor growth by several pathways and further investigations are needed to assess HSF1 as potential cancer drug target.

Keywords: HSF1, HIF-1 α , cancer, proliferation, angiogenesis.**Введение**

В последнее время накапливаются данные, указывающие на участие транскрипционного фактора HSF1 в регуляции онкогенного потенциала, по крайней мере, некоторых типов неопластических клеток, что позволяет рассматривать его в качестве потенциальной мишени для терапии [14; 17]. Основная роль HSF1 сводится к защите клетки от воздействия на нее неблагоприятных условий. В ответ на действие различных стрессов (тепловой шок, гипоксия, свободные радикалы, тяжелые металлы и т. д.) происходит активация HSF1 и приобретение им способности связываться со специфичной последовательностью нуклеотидов, расположенной в промоторе активируемых им генов – HSE. Главными мишенями HSF1 являются гены белков теплового шока (HSPs – HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 and HSP27). HSPs представляют собой шапероны, функциями которых являются: восстановление по-

врежденных белков, предотвращение их агрегации, а также направление неправильно упакованных белков на деградацию [13; 3].

Необходимо отметить, что эти белки, в дополнение к их защитной функции, могут также участвовать в стабилизации некоторых белков, являющихся ключевыми регуляторами клеточной пролиферации и выживаемости (Cdk4, HER2/ErbB2, Akt, и т. п.) и в регуляции множества сигнальных молекул, включая MAPK и mTOR [14; 3].

Влияние HSF1 на возникновение опухолей наблюдалось в различных модельных системах. Показано, что дефицит HSF1 приводит к снижению частоты образования спонтанных опухолей у мышей с нокаутом *p53*, существенному изменению у них спектра спонтанных опухолей [3; 12], а также к ингибированию процесса канцерогенеза в коже, вызванного мутацией в *H-ras* [3].

Однако данные о влиянии HSF1 на развитие опухолей неоднозначны. С одной стороны, во мно-

гих типах опухолей наблюдается повышенное содержание HSP28, HSP70 и HSP90, которое коррелирует с увеличением уровня экспрессии HSF1 [6; 2; 15; 18]. Считается, что повышенный уровень HSF1 и HSPs способствует развитию опухолей путем ингибирования процесса программируемой клеточной смерти вследствие предотвращения образования неправильно упакованных белков, а также специфичной положительной регуляции экспрессии и функционирования некоторого числа антиапоптотических белков, таких как Bag3, Bcl-XL, Mcl-1, и Bcl-2 [7]. Кроме того, некоторые данные указывают, что увеличение активности HSF1 может стимулировать онкогенез и через HSPs-независимые механизмы, включая нарушения в регуляции митоза и нестабильность генома [16], изменения регуляции клеточной пролиферации, метаболизма глюкозы и выживаемости [14; 3].

С другой стороны, ряд данных указывает на негативное влияние гиперактивности HSF1 на пролиферацию и/или выживаемость неопластических клеток. Например, было показано, что экспрессия конститутивно-активной формы HSF1 индуцирует Fas-опосредованный апоптоз [19] и снижает онкогенное влияние активированного Ras за счет ингибирования экспрессии *c-fos* [1].

Чтобы исследовать влияние изменений активности HSF1 на опухолевый рост и оценить возможности ингибирования прогрессии рака ободочной кишки путем различных модификаций функции HSF1, нами были получены субклинки клеток HCT116 с лентивирусными конструкциями, вызывающими увеличение или снижение активности HSF1. Анализ полученных линий показал, что модификации активности HSF1 могут влиять на рост опухолей, воздействуя как на размножение неопластических клеток в результате модуляции активности MAP-киназы Erk, так и на их ангиогенную активность за счет изменения уровня экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 α (Hypoxia Induced Factor 1 α). Таким образом, снижение активности HSF1 может приводить к увеличению скорости роста по крайней мере некоторых типов опухолей, что указывает на необходимость более тщательного изучения возможностей применения ингибиторов функции HSF1 для терапии онкологических заболеваний.

Материалы и методы

Клетки. Клетки рака ободочной кишки человека HCT116 (p53+/-, CCL-247, ATCC) и клетки HEK293T (CRL-11268, ATCC) культивировали в среде DMEM (SH300003.04, HyClone) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; SH30070.03, HyClone) и пенициллина/стрептомицина (15140, GIBCO) при 37 °C в атмосфере 5 %-ного CO₂. Для создания теплового шока клетки инкубировали при 43 °C в течение 45 мин.

Создание конструкций. Конститутивно-активная (делеция аминокислот с 203 по 315), доминантно-негативная (делеция аминокислот с 455 по 523) формы HSF1 человека, а также дикий тип HSF1, клонированные в плазмиду pcDNA 3.1(+) (Invitrogen), были любезно предоставлены Dr. Richard Voellmy (Отделение Биохимии и Молекулярной Биологии, Университет Майами, Медицинская школа Миллера). Эти последовательности HSF1 были клонированы в лентивирусный вектор pLenti6 по сайтам рестрикции NheI/EcoRI. Для создания конструкции shHSF1, экспрессирующей ми-РНК к HSF1 был ис-

пользован лентивирусный вектор pLKO (Sigma). По сайтам рестрикции AgeI/EcoRI в него были клонированы смысловая последовательность, соответствующая нуклеотидам с 353 по 373 мРНК HSF1 человека (5'-AAGTACTTCAAGCACAACAAC-3'), шпилька, антисмысловая последовательность, комплементарная смысловой и поли-Т-последовательность для терминирования транскрипции [20].

Для создания вектора, содержащего HSF1-респонсивные элементы (HSE), были синтезированы следующие олигонуклеотиды (Evrogen):

смысловая последовательность:

5'-CTAGCAGACCCGAAACTGCTGGAAGATTCCCGAAACTTCTGGT-3'

антисмысловая последовательность:

5'-CTAGACCAGAAGTTTAGGGAATCTCCAGCAGTTTCGGGTCTG-3'

Образованный в результате отжига и лигирования указанных олигонуклеотидов фрагмент двуцепочечной ДНК, в состав которого была включена четырежды повторяющаяся последовательность HSE, был клонирован в вектор pLentiA-mCMV-Luc-пуго по сайту рестрикции эндонуклеазы XbaI. Вектор pLentiA был любезно предоставлен проф. П.М. Чумаковым (Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта, Москва). Правильная ориентация клонированных фрагментов была подтверждена с помощью рестрикционного анализа и сиквенирования ДНК (Evrogen).

Получение клеточных субклин, стабильно экспрессирующих созданные конструкции. Вирусы, необходимые для инфекции эукариотических клеток, получали путем ко-трансфекции в клетки HEK293T следующих плазмид: pLenti6, pLentiA и pLKO, содержащие созданные конструкции, и хелперных плазмид (dR 8.2 и pVSV-G). Трансфекцию проводили, используя кальций-фосфатный метод. Последующее заражение линии HCT116 рекомбинантными вирионами, полученными через 24–72 ч после трансфекции, проводили, используя супернатант культур пакующих клеток. Последующую селекцию инфицированных клеточных культур проводили в течение 6 – 7 дней в среде, содержащей 1 мкг/мл пуромицина (P8833, Sigma), для векторов pLentiA и pLKO и 5 мкг/мл бластицидина (R210-01, Invitrogen) для вектора pLenti6.

Детекция мРНК трансдуцированных конструкций методом ОТ-ПЦР. Тотальную мРНК выделяли с помощью TRI Reagent (T9424, Sigma). Реакцию обратной транскрипции проводили, как описано ранее [8]. Для определения экспрессии соответствующих конструкций были использованы следующие праймеры:

для Act-HSF1, wt-HSF1, shHSF1

прямой 5'-TGACGGACGTGCAGCTGATG-3',

обратный 5'-CAGGCTACGCTGAGGCACTT-3';

для dN-HSF1, wt-HSF1, shHSF1

прямой 5'-GACAAGAATGAGCTCAGTGAC-3',

обратный 5'-AACAACCTGCAGGGTCAGTC-3'.

Для определения мРНК α -тубулина использовали следующие праймеры:

прямой 5'- GTTGGTCTGGAATTCTGTCTCAG -3'

обратный 5'- AAGAAGTCCAAGCTGGAGTTC -3'.

Анализ люциферазной активности проводили, используя Steady-Glo Luciferase Assay System (E2510, Promega), согласно протоколу производителя; полученные значения нормализовали по концентрации белка.

Определение скорости роста клеточных культур. Клетки HCT116 рассевали в 6-луночные платы по 20 000. Каждые два дня клетки трипсинизировали и считали в камере Горяева. Эксперимент повторяли три раза.

Вестерн-блот анализ. Экстракты клеток лизировали в охлажденном буфере RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate Na, 1% NP-40, 0.1% SDS, 100 mM PMSF, 1 mM pepstatin A и 1 mM E64). Концентрацию белков определяли с помощью protein assay system (BioRad). Брали по 20 мкг белков. Электрофорез проводили в 12% SDS полиакриламидном геле; белки переносили на мембрану PVDF (RPN303F, Amersham GE Healthcare). Использовали антитела, специфичные к Erk (#9102, Cell Signaling), фосфо- Erk (#9106, Cell Signaling), HIF-1 α (610959, BD Transduction Laboratories) и β -актину (sc-81178, Santa Cruz). После инкубации с первичными антителами мембрану обрабатывали вторичными антителами (анти-мышиные/кроличьи- HPR, NA931V, Amersham GE Healthcare). Для проявки использовали хемолуминисцентный реагент ECL Plus (RPN2132, Amersham GE Healthcare) согласно протоколу производителя.

Анализ роста опухолевых ксенографтов. Эксперименты на животных проводили как было описано ранее [10]. В работе использовались самки бестимусных мышей линии D2CJ в возрасте 6–8 недель. Каждому животному подкожно прививалось по 2 опухоли (10^6 клеток, суспендированных в 100 мкл физиологического раствора). Размер опухолей измерялся каждые 3 дня, их объем высчитывался по формуле:

$$V = IЧ(шир) \times Ч(дл) \times 0,5$$

Продолжительность эксперимента составляла 3 недели. Образовавшиеся опухоли использовали для иммуногистохимического анализа. Эксперименты повторяли как минимум 2 раза.

Иммуногистохимический анализ. Ткани опухолей фиксировали в 4 %-ном нейтральном формалине в течение 24 ч и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали МКА к CD34 (553731, BD Biosciences Pharmingen). Связывание первичных антител детектировали с помощью биотинилированных антикрысиных вторичных антител (559286, BD Biosciences Pharmingen) с последующей обработкой стрептавидином-HRP (K0690, Dako). Связывание первичных антител к HIF-1 α (Ab8366, Abcam) детектировали с помощью анти-мышиной Labelled Polymer-HRP (K4006; Dako). Активность пероксидазы выявляли с помощью 3',3'-диаминобензидина (DAI; K3468, Dako) согласно протоколу производителя. После этого препараты окрашивали гематоксилином Майера.

Подсчет сосудов в опухолевой ткани. Подсчет CD34 $^{+}$ кровеносных капилляров проводился при увеличении $\times 100$. В каждой экспериментальной группе исследовали срезы 8–12 опухолей, для каждой опухоли анализировали 5 полей зрения.

Статистический анализ. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Для определения статистической значимости различий использовали *t*-тест Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Для моделирования различных изменений активности HSF1 в опухолевых клетках были созданы лентивирусные конструкции, экспрессирующие дикий тип (wt), конститутивно-активную (Act), доминантно-негативную (dN) формы HSF1 и мРНК HSF1. Путем инфицирования этими конструкциями клеток рака ободочной кишки человека линии HCT116 были созданы сублинии, стабильно экспрессирующие трансгены. Присутствие и функционирование введенных последовательностей

HSF1 в полученных сублиниях через 15–30 дней после инфекции было подтверждено с помощью ОТ-ПЦР, а в сублинии, несущей shHSF1, наблюдалось снижение уровня мРНК HSF1 (рис. 1а). Для анализа изменений уровня транскрипционной активности HSF1 в полученных культурах клеток, мы создали и трансдуцировали в них репортерную конструкцию pLentiA-mCMV- HSE-Luc-puro, содержащую HSF1-респонсивные элементы. Анализ люциферазной активности показал, что экспрессия Act-HSF1 приводит к 5-7-кратному увеличению активности HSF1 в нормальных условиях (37 °C), тогда как результатом экспрессии dN-HSF1 является 60–80-кратное снижение транскрипционной активности HSF1 в условиях теплового шока (43 °C, 45 мин; рис. 1б).

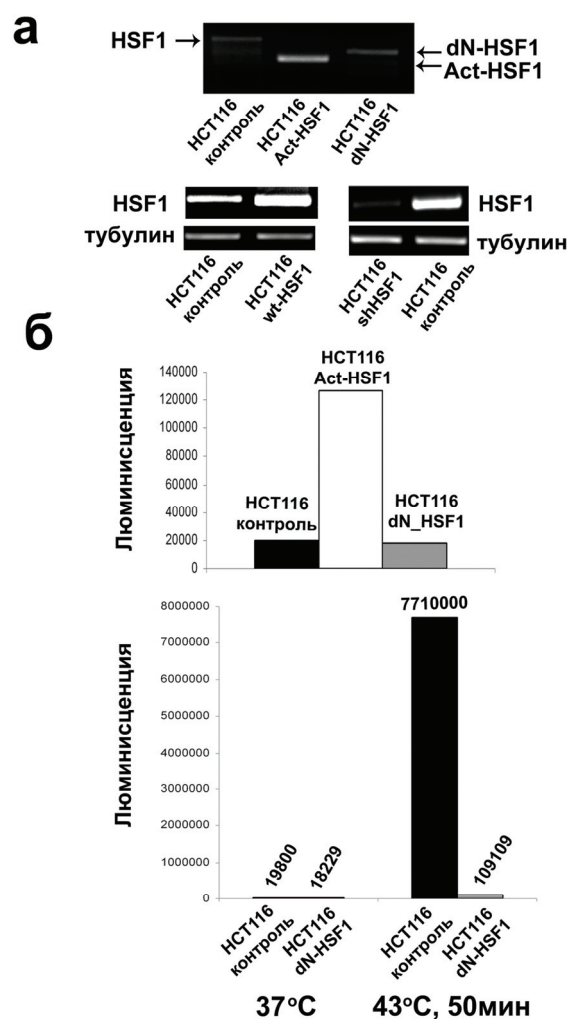


Рис. 1. Влияние трансдукции конструкций HSF1-Act, HSF1-wt, HSF1-dN и shHSF1 на уровень мРНК HSF1 (А) и на экспрессию люциферазного репортера, содержащего HSF1-респонсивные элементы (HSEs) (Б):

А: наверху – наличие мРНК введенных конструкций HSF1-Act и HSF1-dN; внизу – влияние HSF1-wt и shHSF1 на уровень мРНК HSF1; анализ содержания мРНК α -тубулина использован для контроля количества нанесенных образцов.

Б: анализ люциферазной активности в клетках HCT116, экспрессирующих HSF1-Act и HSF1-dN при нормальных условиях (37 °C) (наверху) и HSF1-dN сразу после теплового шока (43 °C, 45 min) (внизу).

Исследование кинетики роста подкожных ксенографтов полученных сублиний клеток в бестимусных мышах (рис. 2а) показало, что трансдукция Act-HSF1 и wt-HSF1 в HCT116 приводит к снижению скорости опухолевого роста ($p < 0,05$), тогда как ингибирование активности HSF1 за счет экспрессии shHSF1, наоборот, ускоряет рост опухолей ($p < 0,05$). Экспрессия доминантно-негативной формы HSF1 также сопровождалась некоторым увеличением скорости роста опухолей, однако оно было статистически незначимым (рис. 2а).

Известно, что скорость роста опухолей зависит как от пролиферативной, так и от ангиогенной активности неопластических клеток. Анализ кинетики размножения клеток полученных сублиний *in vitro* показал, что экспрессия Act-HSF1 замедляет рост ($p < 0,05$), что согласуется с результатом экспериментов, проведенных *in vivo*. При этом ни wt-HSF1, ни shHSF1 не влияли на скорость роста HCT116 *in vitro* (рис. 2б).

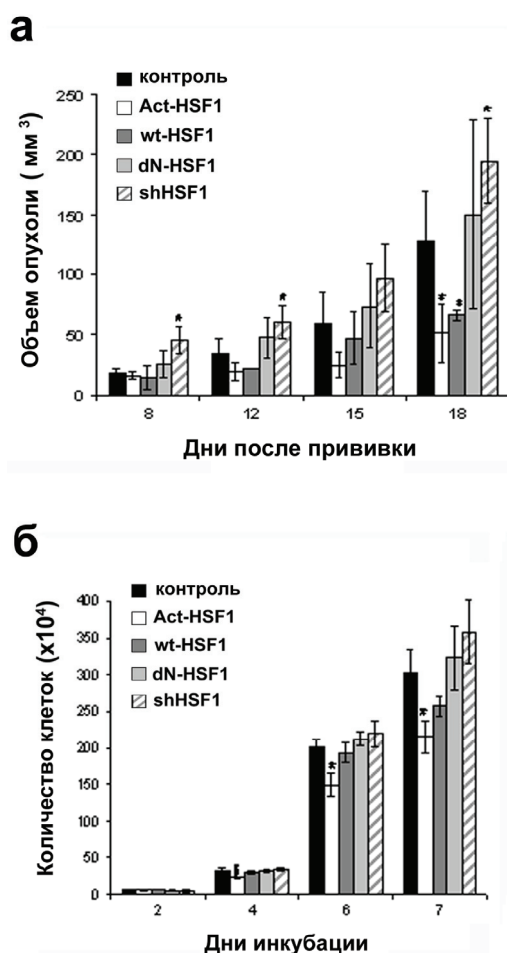


Рис. 2. Влияние экспрессии HSF1-Act, HSF1-wt, HSF1-dN и shHSF1 на скорость роста подкожных ксенографтов (А) и культур клеток *in vitro* (Б):

А: приведены типичные данные, полученные при анализе 20 опухолей в каждом из двух экспериментов (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, * $p < 0,05$, *t*-тест Стьюдента).

Б: представлены типичные результаты одного из трех экспериментов (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, * $p < 0,02$, *t*-тест Стьюдента).

Это несоответствие между влиянием на скорость роста клеток HCT116, содержащих shHSF1, *in*

vivo и *in vitro*, могло объясняться ангиогенной активностью клеток, определяющей степень васкуляризации и скорость роста опухолей.

Иммуногистохимический анализ срезов опухолевых тканей, окрашенных антителами к CD34, узнающих эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, показал, что результатом экспрессии конститутивно-активной формы HSF1 является уменьшение числа сосудов с просветами ($p < 0,05$), тогда как ингибирование активности HSF1 приводит к противоположному эффекту ($p < 0,05$).

Экспрессия HSF1 дикого типа и доминантно-негативной формы HSF1 не оказывала статистически достоверного влияния на количество сосудов в опухолевых тканях (рис. 3; см. вклейку).

В основе воздействия изменений функции транскрипционного фактора HSF1 на пролиферативную и ангиогенную активность клеток могут лежать несколько механизмов, включая HSP-опосредованное изменение стабильности/активности MAPKs, Akt, mTOR [14; 3] и HIF-1 α ; модуляция функций других транскрипционных факторов, регулирующих клеточный цикл и апоптоз – p53 [9] и др.

Так как ключевыми регуляторами клеточной пролиферации и ангиогенеза считаются, соответственно, MAP-киназы Erk1/2 и HIF-1 α [11; 4], мы провели анализ содержания фосфорилированных (активных) форм Erk и белка HIF-1 α в клетках HCT116, экспрессирующих различные формы HSF1.

Вестерн-блот анализ показал снижение содержания фосфорилированных форм Erk (p42 и p44) в клетках, экспрессирующих конститутивно-активную форму HSF1.

Влияние экспрессии HSF1 дикого типа на содержание активированного Erk было менее выраженным, тогда как доминантно-негативная форма HSF1 не изменяла содержание активных форм Erk (рис. 4а).

Однако обе указанные формы HSF1 увеличивали содержание HIF-1 α . При этом в клетках с конститутивно-активным HSF1, наоборот, наблюдалось значительное снижение уровня белка HIF-1 α (рис. 4а). Результаты иммуногистохимического анализа опухолевых срезов, окрашенных антителами к HIF-1 α , полностью согласовывались с данными вестерн-блот анализа (рис. 4б).

Заключение

Полученные результаты впервые демонстрируют разнообразные эффекты различных модификаций функции транскрипционного фактора HSF1 на пролиферацию и ангиогенную активность клеток рака ободочной кишки человека и скорость роста их ксенографтов в бестимусных мышах.

Эти эффекты по крайней мере частично связаны с изменениями активности ключевых регуляторов клеточного цикла и ангиогенеза – белков Erk1/2 и HIF-1 α .

Следует подчеркнуть, что предлагаемое в качестве нового терапевтического подхода ингибирование функции HSF1 приводит в исследованной модели не к замедлению, а к ускорению опухолевого роста, тогда как активация функции HSF1, наоборот, замедляет опухолевую прогрессию.

Противоположные эффекты ингибирования активности HSF1 на скорость роста опухолей, полученные на разных моделях/клеточных линиях, указывают на необходимость проведения более углубленных исследований для оценки возможности и путей использования транскрипционного фактора HSF1 в качестве терапевтической мишени.

Литература

1. Chen C., Xie Y., Stevenson M.A. et al. Heat Shock Factor 1 Represses Ras-induced Transcriptional Activation of the c-fos Gene // J Biol Chem. – 1997. – 272. – P. 26803–6.
2. Ciocca D.R., Calderwood S.K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications // Cell Stress Chaperones. – 2005. – 10. – P. 86–103.
3. Dai C., Whitesell L., Rogers A.B., Lindquist S. Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis // Cell. – 2007. – 130. – P. 1005–18.
4. Diaz-Gonzalez J.A., Russell J., Rouzaut A. et al. Targeting hypoxia and angiogenesis through HIF-1 α inhibition // Cancer Biol Ther. – 2005. – 4. – P. 1055–62.
5. Hartl F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding // Nature. – 1996. – 381. – P. 571–9.
6. Hoang A.T., Huang J., Rudra-Ganguly N. et al. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma // Am J Pathol. – 2000. – 156. – P. 857–64.
7. Jacobs A.T., Marnett L.J. HSF1-Mediated BAG3 Expression Attenuates Apoptosis in 4-Hydroxynonenal Treated Colon Cancer Cells via Stabilization of Antiapoptotic Bcl-2 Proteins // J Biol Chem. – 2009. – 284. – P. 9176–83.
8. Kopnin P.B., Agapova L.S., Kopnin B.P., Chumakov P.M. Repression of sestrin family genes contributes to oncogenic Ras-induced reactive oxygen species up-regulation and genetic instability // Cancer Res. – 2007. – 67. – P. 4671–8.
9. Logan I.R., McNeill H.V., Cook S. et al. Heat shock factor-1 modulates p53 activity in the transcriptional response to DNA damage // Nucleic Acids Res. – 2009. – 37. – P. 2962–73.
10. Logunov D.Y., Ilyinskaya G.V., Cherenova L.V. et al. Restoration of p53 tumor-suppressor activity in human tumor cells in vitro and in their xenografts in vivo by recombinant avian adenovirus CELO-p53 // Gene Ther. – 2004. – 11. – P. 79–84.
11. Meloche S., Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition // Oncogene. – 2007. – 26. – P. 3227–39.
12. Min J.N., Huang L., Zimonjic D.B. et al. Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors // Oncogene. – 2007. – 26. – P. 5086–97.
13. Morimoto R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators // Genes Dev. – 1998. – 12. – P. 3788–96.
14. Solimini N.L., Luo J., Elledge S.J. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells // Cell. – 2007. – 130. – P. 986–8.
15. Tang D., Khaleque M.A., Jones E.L. et al. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo // Cell Stress Chaperones. – 2005. – 10. – P. 46–58.
16. Wang Y., Theriault J.R., He H. et al. Expression of a Dominant Negative Heat Shock Factor-1 Construct Inhibits Aneuploidy in Prostate Carcinoma Cells // J Biol Chem. – 2004. – 279. – P. 32651–9.
17. Whitesell L., Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy // Expert Opin Ther Targets. – 2009. – 13. – P. 469–78.
18. Whitesell L., Lindquist S.L. HSP90 and the chaperoning of cancer // Nat Rev Cancer. – 2005. – 5. – P. 761–72.
19. Xia W., Voellmy R., Spector N.L. Sensitization of Tumor Cells to Fas Killing // J Cell Physiol. – 2000. – 183. – P. 425–31.
20. Yin C., Xi L., Wang X. et al. Silencing heat shock factor 1 by small interfering RNA abrogates heat shock-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in mice // J Mol Cell Cardiol. – 2005. – 39. – P. 681–9.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 618.19-006.6:612.017.34

*Беришвили А.И., Лактионов К.П., Левкина Н.В., Кочоян Т.М., Керимов Р.А., Поликарпова С.Б.***КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ
С БЕЗРЕЦИДИВНОЙ И ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ БОЛЬНЫХ
ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМОЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН***Контактная информация***Беришвили Александр Иосифович, д.м.н., в.н.с. отделения опухолей женской репродуктивной системы НИИ КО***адрес:** 115478 Москва, Каширское шоссе, 23, тел. +7(495)324-98-83**e-mail:** aberishvili@yandex.ru

Статья поступила 26.06.2011, подписана в печать 18.01.2012.

Резюме

ОИФ РМЖ является наименее редко встречающейся и наиболее агрессивно протекающей частью РМЖ. ОИФ РМЖ составляет менее 5% всего РМЖ. Диагноз устанавливается на основании быстрого прогрессирования таких признаков как увеличение объема, покраснение и отек молочной железы. Современным стандартом лечения ОИФ РМЖ является химиотерапия с включением антрациклинов, возможно в комбинации с таксанами, радикальная мастэктомия с подмышечной лимфодиссекцией для пациенток, ответивших на химиотерапию, лучевая терапия и гормонотерапия при наличии положительного рецепторного статуса. В наше исследование вошли 299 больных ОИФ РМЖ, получавших лечение в РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН с 1990г. по 2005г., которым проведен анализ ряда клинических и морфологических признаков с целью установления их влияния на БРВ и ОВ данной категории больных. При однофакторном анализе наиболее важными прогностическими факторами были стадия заболевания и гистологическое строение опухоли.

Ключевые слова: отечно-инфильтративная форма рака молочной железы, выживаемость, факторы прогноза.*Berishvili A., Laktionov K., Levkina N., Kochoian T., Kerimov R., Polycarpova S.***CLINICAL AND MORPHOLOGICAL FACTORS
AND THEIR CORRELATION WITH DISEASE-FREE AND OVERALL SURVIVAL
OF PATIENTS WITH INFLAMMATORY BREAST CANCER***Russian cancer research center RAMS, Moscow***Resume**

IBC is diagnosed on the basis of signs of rapid progression, such as localized or generalized breast induration, redness and edema. IBC accounts for less than 5% of all diagnosed breast cancers. IBC is the most lethal form of primary breast cancer. The current consensus treatment is first-line chemotherapy with an anthracycline-based regimen, possibly combined with a taxane, followed by mastectomy and axillary lymph node dissection for responders, locoregional radiotherapy and, when appropriate, hormone therapy. We evaluated clinical and pathological characteristics that could affect survival in 299 women with IBC consecutively treated in our institution between 1990 and 2005. In univariate analysis most important prognostic factors of survival were stage and histological type of tumor.

Key words: inflammatory breast cancer, survival, prognostic factors.**Введение**

ОИФ РМЖ является наименее редко встречающейся и наиболее агрессивно протекающей частью РМЖ. ОИФ РМЖ составляет менее 5% всего РМЖ [1]. Диагноз устанавливается на основании быстрого прогрессирования таких признаков как увеличение объема, покраснение и отек молочной железы. Хирургия и/или лучевая терапия позволяют добиться 5-летней выживаемости 15% [2]. Современным стандартом лечения ОИФ РМЖ является химиотерапия с включением антрациклинов, возможно в комбинации с таксанами, радикальная мастэктомия с подмышечной лимфодиссекцией для пациенток, ответивших на химиотерапию, лучевая терапия и гормонотерапия при наличии положительного рецепторного статуса [3; 4]. Польза от проведения высокодозной химиотерапии с трансплантацией костного мозга до настоящего времени четко не установлена [5; 6]. Несмотря на комплексность лечения, прогноз данного заболевания остается неблагоприятным, а результаты 3-летней ОВ не превышают 40%, тогда как при местнораспрост-

раненном (МР) РМЖ, куда входит ОИФ РМЖ, она достигает 85% [2; 3].

Наиболее важные прогностические факторы раннего РМЖ (размер опухоли и статус лимфатических узлов) при ОИФ РМЖ не работают, т.к. точное измерение размеров опухоли зачастую невозможно, а большинство больных имеет поражение подмышечных лимфоузлов уже на момент установления диагноза.

Целью настоящего исследования было оценить клинические и морфологические особенности ОИФ РМЖ, влияющие на БРВ и ОВ и позволяющие прогнозировать результаты лечения данной категории больных.

Материал и методы

В основу работы положены результаты наблюдения за 299 больными ОИФ РМЖ, проходившими лечение с 1990 по 2005г. в РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН.

Возраст больных колебался от 30 до 73 лет, а средний возраст составил 51+/-10 лет.

В репродуктивном периоде находились 126 (42%) пациентки, а в менопаузе – 173 (58%).

Распределение больных по стадиям было следующим: $T_{4d}N_0M_0$ – 10 (3,3%), $T_{4d}N_{1-3}M_0$ – 179 (59,9%) и $T_{4d}N_{0-3}M_1$ – 110 (36,8%) больных. Правая молочная железа была поражена у 150 (50,2%) больных, левая – у 149 (48,8%).

Первичная (истинная) отечно-инфильтративная форма рака молочной железы встречалась у 59 (19,7%) больных, вторичная – у 240 (81,2%).

По гистологическому строению преобладал инфильтративный протоковый рак (ИПР) – 121 (40,5%) пациентка, ИДР встречался реже – у 45 (15,1%), рак без указания формы и редкие формы рака (смешанный дольково-протоковый рак, тубулярный рак, медулярный рак, рак с метаплазией, слизистый рак, папиллярный рак) – у 108 (36,1%) и 15 (5%) пациенток соответственно. Только цитологическая верификация диагноза проводилось у 10 (3,3%) пациенток.

Рецепторный статус опухоли определялся у 225 больных. Опухоль была рецепторположительной по эстрогенам и прогестерону (R^+P^+) у 39 (17,3%) больных, рецепторположительной только по эстрогенам – у 34 (15,1%) (R^+P^-), рецепторположительной только по прогестерону – у 22 (9,7%) (R^-P^+) и рецептор-негативной по обоим видам рецепторов (R^-P^-) – у 130 (57,7%) больных.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica for Windows v.6.0 (StatSoft Inc., США). Достоверность различий признаков в сопоставляемых группах оценивали с использованием t-критерия Стьюдента (ДИ не менее 95 %, $p < 0,05$). Показатели выживаемости вычисляли методом построения таблиц дожития по Kaplan-Meier.

Результаты

Одним из важных вопросов данного исследования явилось определение влияния формы заболевания на его прогноз. Для этого была проанализирована БРВ и ОВ пациенток ОИФ РМЖ. Установлено, что средняя БРВ у пациенток с первичной ОИФ РМЖ составила $57,0 \pm 9,8$ мес. (95 %-ный ДИ составил $37,8-76,3$ мес.) с медианой $22 \pm 4,4$ мес. и $62,6 \pm 6,0$ мес. (95 %-ный ДИ составил $50,8-73,4$ мес.) с медианой $24 \pm 2,4$ мес. у пациенток с вторичной ОИФ РМЖ.

Анализ БРВ по статусу региональных лимфатических узлов также не выявил достоверных различий. Так, для пациенток с N_0 средняя БРВ составила $71,9 \pm 22,1$ мес. (95 %-ный ДИ составил $28,7-115,1$ мес.) с медианой $20 \pm 1,7$ мес., а для пациенток с N_{1-3} – $69,8 \pm 6,8$ мес. (95 %-ный ДИ составил $56,5-83,2$ мес.) с медианой $24 \pm 3,5$ мес.

Статистически достоверные различия в кривых БРВ получены в зависимости от гистологического строения опухоли. При ИПР средняя БРВ составила $75,5 \pm 8,9$ мес. (95 %-ный ДИ составил $58,1-92,9$ мес.) с медианой $33 \pm 8,9$ мес., при ИДР – $47,4 \pm 8,0$ мес. (95 %-ный ДИ составил $31,7-63,2$ мес.) с медианой $35 \pm 4,4$ мес., а при редких формах и раке без указания формы – $45,6 \pm 6,3$ мес. (95 %-ный ДИ составил $33,3-57,8$ мес.) с медианой $18 \pm 2,1$ мес. ($p < 0,013$) (рис. 1, см. вклейку).

Анализ БРВ в зависимости от рецепторного статуса опухоли позволил установить, что у больных с R^+P^+ средняя БРВ составила $46,3 \pm 13,2$ мес. (95 %-ный ДИ составил $20,3-72,2$ мес.) с медианой

$21 \pm 3,2$ мес., для пациенток с R^+P^- – $61,8 \pm 13,3$ мес. (95 %-ный ДИ составил $35,8-87,9$ мес.) с медианой $34 \pm 7,3$ мес., для пациенток с R^-P^+ – $52,5 \pm 15,0$ мес. (95 %-ный ДИ составил $23,1-89,1$ мес.) с медианой $26 \pm 8,6$ мес., а для пациенток с R^-P^- – $53,8 \pm 6,0$ мес. (95 %-ный ДИ составил $42,0-65,6$ мес.) с медианой $24 \pm 2,8$ мес.

В проведенном исследовании ОВ составила $71,6 \pm 4,9$ мес. (95 %-ный ДИ составил $61,9-81,1$ мес.) с медианой $42 \pm 2,9$ мес. Анализ ОВ больных первичной и вторичной ОИФ РМЖ показал, что форма заболевания не оказывает статистически значимого влияния на ОВ данной категории больных, составив $64,3 \pm 8,7$ мес. (95 %-ный ДИ составил $47,3-81,2$ мес.) с медианой $47 \pm 22,1$ мес. и $71,7 \pm 5,5$ мес. (95 %-ный ДИ составил $60,9-82,5$ мес.) с медианой $39 \pm 2,9$ мес. соответственно.

Правильная постановка стадии заболевания имеет принципиальное значение для прогноза ОИФ РМЖ. В частности, ОВ пациенток с $T_{4d}N_{0-3}M_0$ ($n=168$) составила $86,3 \pm 6,6$ мес. (95 %-ный ДИ составил $73,4-99,1$ мес.) с медианой $45 \pm 8,5$ мес., тогда как у пациенток с $T_{4d}N_{0-3}M_1$ ($n=96$) – только $42,1 \pm 3,8$ мес. (95 %-ный ДИ составил $34,6-49,5$ мес.) с медианой $32 \pm 6,3$ мес. ($p=0,001$; рис. 2).

Как видно из рис. 2, пациентки с IIВ стадией заболевания имели достоверно лучшие результаты ОВ по сравнению с пациентками с IV стадией. Это позволило определить стадию заболевания как важный фактор прогноза ОИФ РМЖ.

В современной литературе имеются указания о влиянии статуса региональных лимфатических узлов на ОВ больных РМЖ. С целью определения значения данного фактора нами изучена ОВ 10 больных с $T_{4d}N_0M_0$ и 158 больных с $T_{4d}N_{1-3}M_0$: ОВ составила $82,4 \pm 21,5$ мес. (95 %-ный ДИ составил $40,3-124,6$ мес.), медиана не достигнута и $85,2 \pm 6,7$ мес. (95 %-ный ДИ составил $72,1-98,4$ мес.) с медианой $45 \pm 8,7$ мес. ($p=0,14$). Полученные результаты не подтвердили прогностическое значение поражения региональных лимфатических узлов (различия статистически недостоверны), но, возможно, большее количество больных в подгруппах позволит осветить этот вопрос более точно. Можно предположить, что в прогнозе ОИФ РМЖ решающую роль играет не столько местное распространение заболевания (индекс N), сколько ее склонность к диссеминации и развитию отдаленных метастазов (индекс M).

Среди признаков, наиболее часто изучаемых в различных исследованиях, следует особо выделить гистотип опухоли.

Гистологическое строение опухоли оказалось фактором, статистически достоверно влияющим на ОВ больных ОИФ РМЖ. При ИПР ($n=105$) ОВ составила $95,1 \pm 8,8$ мес. (95 %-ный ДИ составил $77,8-112,3$ мес.) с медианой $71 \pm 18,6$ мес., при ИДР ($n=41$) – $59,4 \pm 8,1$ мес. (95 %-ный ДИ составил $43,4-75,4$ мес.) с медианой $42 \pm 6,6$ мес., а для редких форм рака и рака без указания формы ($n=109$) – $50,1 \pm 5,3$ мес. (95 %-ный ДИ составил $39,7-60,5$ мес.) с медианой $29 \pm 4,2$ мес. ($p=0,001$; рис. 3).

Как видно из рис. 3, ИПР характеризуется достоверно лучшей ОВ по сравнению с ИДР и редкими формами рака, что позволяет отнести гистологическое строение опухоли к факторам прогноза ОВ больных ОИФ РМЖ.

Следующей характеристикой ОИФ РМЖ является рецепторный статус опухоли. Ему придается большое прогностическое значение при РМЖ, поэтому мы сочли необходимым дать подробную характеристику ОВ для всех изученных вариантов.

Таблица 1
ОВ в зависимости от рецепторного статуса опухоли
больных ОИФ РМЖ

Фактор	Ср. (мес.)	Медиана (мес.)	п б-ных	р
РЭ ⁺ РП ⁺	71,2±13,3	36±5,9	34	0,49
РЭ ⁺ РП ⁻	69,9±11,4	48±11	28	
РЭ ⁻ РП ⁺	79,7±19,2	40±10,9	19	
РЭ ⁻ РП ⁻	57,1±5,2	39±4,4	120	

Из представленной таблицы видно, что различия в отдаленных результатах не достигают статистической значимости ($p=0,49$) вне зависимости от рецепторного статуса опухоли, будь то рецепторнегативная или позитивная форма.

Результаты и обсуждение

Редкость ОИФ РМЖ, а также агрессивность ее течения обуславливают повышенный интерес к ее лечению, а отсутствие рандомизированных исследований и ее включение в местнораспространенный РМЖ затрудняет анализ полученных данных. Это объясняет интерес к факторам прогноза выживаемости данной категории больных. По данным ряда ретроспективных исследований важное прогностическое значение для больных ОИФ РМЖ имеют следующие факторы: ответ на неоадьювантную химиотерапию, отсутствие вовлечения лимфатических узлов, молодой возраст больных, позитивный рецепторный статус, отсутствие диффузной эритемы кожи, отсутствие пальпируемых опухолевых масс или отдаленных метастазов на момент установления диагноза, малый размер опухоли [1-7].

В ретроспективном исследовании L.Curcio et al. [8] 3-летняя ОВ для IIIВ стадии составила 41,3% по сравнению с 12,5% при IV стадии заболевания ($p=0,006$).

Нами получены аналогичные результаты: пациентки с IIIВ стадией заболевания имели достоверно лучшие результаты ОВ по сравнению с пациентками с IV стадией. Это позволило определить стадию заболевания как важный фактор прогноза ОИФ РМЖ.

Литература

1. DeBoer R.H. Multimodality therapy in inflammatory breast cancer: is there a place for surgery? / R.H. DeBoer, W.H. Allum, S.R. Ebbs et al. // Ann. Oncol. – 2000. – Vol. 11. – p. 1147–53.
2. Palangie T. Prognostic factors in inflammatory breast cancer and therapeutic implications / T. Palangie, V. Mosseri, J. Mihura et al. // Eur. J. Cancer. – 1994. – V. 30. – p. 921–7.
3. Galmarini C. Clinical outcome and prognosis of patients with inflammatory breast cancer / C. Galmarini, C. Garbovesky, D. Galmarini et al. // Am. J. Clin. Oncol. – 2002. – Vol. 25. – p. 172–7.
4. Amparo R.S. Inflammatory breast carcinoma: pathological or clinical entity? / R.S. Amparo, C.D. Angel, L.H. Ana et al. // Breast Cancer Res. Treat. – 2000. – Vol. 64. – p. 269–73.
5. Curcio L.D. Beyond palliative mastectomy in inflammatory breast cancer - a reassessment of margin status / L.D. Curcio, E. Rupp, W.L. Williams et al. // Ann. Surg. Oncol. – 1999. – Vol. 6. – p. 249–54.
6. Attia-Sobol J. Treatment results, survival and prognostic factors in 109 inflammatory breast cancer: univariate and multivariate analysis / J. Attia-Sobol, J.P. Ferriere, H. Cure et al. // Eur. J. Cancer. – 1993. – Vol. 29. – p. 1081–8.
7. Brooks H.L. Inflammatory breast carcinoma: a community hospital experience / H.L. Brooks, N. Mandava, W.F. Pizzi et al. // J. Am. Coll. Surg. – 1998. – Vol. 186. – p. 622–9.
8. Kleer C. Molecular biology of breast cancer metastasis: Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants / C. Kleer, K. van Golen, S. Merajver // Breast Cancer Res. – 2000. – Vol. 2(6). – p. 423–9.
9. Paradiso A. Cell kinetics and hormonal receptor status in inflammatory breast carcinoma. Comparison with locally advanced disease / A. Paradiso, S. Tommasi, M. Brandi et al. // Cancer – 1989. – Vol. 64. – p. 1922–7.
10. Anderson W.F. Inflammatory breast carcinoma and noninflammatory locally advanced breast carcinoma: distinct clinicopathologic entities? / W.F. Anderson, K.C. Chu, S. Chang // J. Clin. Oncol. – 2003. – Vol. 21. – p. 2254–9.
11. Kaufman M. Review of known prognostic variables / M. Kaufman // Results Probl. Cell Differ. – 2000. – Vol. 140. – p. 77–87.
12. Henderson M. Secondary inflammatory breast cancer: treatment options / M. Henderson, C. McBride // Cancer – 2004. – Vol. 100. – issue 5. – p. 920–8.

Классический признак плохого прогноза РМЖ – негативный рецепторный статус – имеет по одним данным важное прогностическое значение при ОИФ РМЖ [9; 10], а по другим – нет [11]. При ОИФ РМЖ чаще, чем при других формах РМЖ отмечается РЭ негативные опухоли [9]. До 60% больных ОИФ РМЖ имеют рецепторнегативный статус. Отсутствие рецепторов эстрогенов (РЭ) и прогестерона (РП) связано с низкой БРВ и ОВ у пациенток с РМЖ, включая больных ОИФ РМЖ [ibidem].

В проведенном нами исследовании большинство больных (57,7%) также имели рецепторнегативный статус, однако его прогностического значения нами не установлено, также как и прогностического значения поражения лимфатических узлов, в отличие от гистологического строения опухоли, которое оказывало статистически значимое влияние как на БРВ, так и ОВ больных ОИФ РМЖ.

В исследовании, охватывающем 96 больных вторичной ОИФ РМЖ, проведенном группой M. Henderson [12], 5-летняя ОВ составила 36%, а 10-летняя – 18%. При сравнении полученных результатов с таковыми группы больных с первичной ОИФ РМЖ достоверных различий не было, что позволило авторам прийти к выводу об отсутствии необходимости в разделении ОИФ РМЖ на первичную и вторичную формы. В нашем исследовании также не выявлено различий в БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ в зависимости от формы заболевания, а сходные результаты выживаемости больных первичной и вторичной формами заболевания также подтолкнули нас к заключению об отсутствии необходимости в разделении ОИФ РМЖ на такие подгруппы.

Проведенное исследование расширяет наши познания относительно ряда основных клинкоморфологических признаков, характеризующих ОИФ РМЖ, однако только проведение дальнейших мультицентровых генно-молекулярных исследований позволит пролить свет на причины столь агрессивного течения данной формы РМЖ и, соответственно, разработать лечебные мероприятия, направленные на улучшение результатов ее лечения.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.19+618.11]-006.04-031.14:575.113

Т.П. Казубская¹, Д.С. Ходырев², И.В. Процина², В.Д. Ермилова¹, Ю.Г. Паяниди¹, Н.В. Чхиквадзе¹,
В.Ю. Сельчук¹, Э.А. Брага², В.И. Логинов²

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ, ВКЛЮЧАЯ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫЕ

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

²Государственный Научный Центр РФ ГосНИИ генетика, Москва

Контактная информация

Казубская Татьяна Павловна, д-р мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической онкогенетики НИИ клинической онкологии

Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24, тел. +7(499)324-26-85

E-mail: kazubskaya@yahoo.com

Статья поступила: 29.02.2012, принята к печати 29.02.2012.

Резюме

В рамках исследования впервые проведено комплексное изучение статуса метилирования генов-супрессоров *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* в образцах ткани опухолей молочной железы и яичников, а также прилежащей к ним гистологически нормальной ткани. Впервые установлено, что аномальное метилирование промоторной области гена *RASSF1A* выявляется на доклинической стадии развития рака молочной железы и яичников, что позволит в перспективе использовать этот метод в клинической практике в качестве ранней неинвазивной диагностической методики.

Ключевые слова: рак молочной железы и яичников, первично-множественных рак, метилирование, гены *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B*.

T.P. Kazubskaya¹, I.V. Khodyrev², I.V. Pronina², V.D. Ermilova¹, J.G. Payanidi¹, N.V. Chkhikvadze¹,
V.I. Celchuk¹, E.A. Braga², V.I. Loginov²

TUMOR SUPPRESSOR GENES METHYLATION IN BREAST AND OVARIAN CARCINOMA, INCLUDING MULTIPLE PRIMARY TUMORS

¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

²Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics, Moscow

Abstract

The research conducted the first comprehensive study of the methylation status of tumor suppressor genes *RASSF1A*, *RARβ2* and *SEMA3B* in breast and ovarian carcinoma tissue samples, as well as in adjacent histologically normal tissue. For the first time it was found out that abnormal methylation of *RASSF1A* gene promoter region could be detected at the preclinical stage of breast and ovarian cancer, that would help to use this method in clinical practice as a noninvasive technique for early diagnosis.

Key words: breast and ovarian cancer, multiple primary cancers, methylation, *RASSF1A*, *RARβ2* and *SEMA3B* genes.

Введение

Урбанизация и старение населения, ухудшение общей экологической ситуации, техногенные катастрофы приводят к наблюдаемому за последнее десятилетие, неуклонному росту онкологических заболеваний, включая ПМЗО [5; 7].

Под первичной множественностью опухолей в настоящее время понимают независимое возникновение и развитие у одного больного двух или более новообразований. При этом пораженными могут быть не только разные органы различных систем, но и парные органы (молочные железы, легкие и другие). В России показатель заболеваемости ПМЗО на 2005 г. составил 8,3, а на 2010 г. – 11,2 на 100 000 населения, при этом, доля синхронных опухолей из них, составила 33 % [6].

По имеющимся наблюдениям, ПМЗО могут быть одним из проявлений различных наследственных синдромов, которые являются результатом специфических наследственных мутаций, предопределяющих риск развития рака у 50% потомков, с поражением органов ассоциированных с этими

синдромами [3]. Поэтому риск развития полинеоплазии выше для лиц из наследственно отягощенных семей. Самой частой разновидностью семейных опухолевых заболеваний у женщин является наследственный рак молочной железы (РМЖ). Его вклад в общую встречаемость РМЖ составляет примерно 5 – 10 % [2]. Классически разновидности наследственного РМЖ ассоциированы также с высоким риском развития рака яичников (РЯ), поэтому в литературе обычно используется термин «синдром РМЖ/РЯ» (breast-ovarian cancer syndrome). Доля наследственного РМЖ/РЯ в общей заболеваемости неоплазиями яичников ещё более заметна. Считается, что как минимум 10 – 15 % случаев РЯ можно объяснить присутствием генетических факторов [10; 15]. Установлено, что приблизительно в 20 – 30 % развитие наследственных форм РМЖ/РЯ обусловлено наличием мутаций в генах *BRCA1* или *BRCA2*. Однако огромные усилия учёных направлены на идентификацию других генов, ответственных за развитие РМЖ и/или РЯ, которые позволили бы выявлять эти заболевания ещё на доклиническом уровне.

Как и многие злокачественные опухоли, РМЖ и РЯ имеют мультифакторную природу. В их патогенезе важную роль играют онкогены и гены опухолевой супрессии. В основе инактивации генов-супрессоров опухолей и селективного роста злокачественно измененных клеток лежат генетические и эпигенетические повреждения. Генетические изменения включают точечные мутации, делеции, перестройки, тогда как эпигенетические изменения (метилирование) влияют на временной и пространственный контроль экспрессии гена без изменения в последовательности ДНК. Механизмом эпигенетических изменений служит обратимое присоединение метильной группы к цитозину в CG-динуклеотидах (цитозин-гуанин-динуклеотидах), расположенных в регуляторных участках генов. Это явление получило название аномального метилирования генов в опухоли. Считается, что эпигенетические нарушения при малигнизации являются наиболее ранними и могут иметь место задолго до клинической манифестации заболевания [9]. К настоящему времени установлено, что метилирование генов ассоциировано с агрессивной формой опухоли и прогрессией заболевания [2; 14; 18].

Следовательно, определение степени метилирования генов-супрессоров опухолевого роста можно использовать в качестве маркера агрессивности опухолевого процесса для прогноза течения заболевания и для коррекции терапевтической стратегии при лечении РМЖ и РЯ.

Целью работы являлся комплексный анализ метилирования генов-супрессоров *RASSF1A*, *SEMA3B* и *RARβ2* и изучение роли этих генов в развитии рака молочной железы и яичников.

Материалы и методы

Парные образцы опухолевой и гистологически нормальной ткани взяты у пациенток, которые до операции не получали лучевой или химиотерапии. Выборка составила 56 образцов рака молочной железы и 50 эпителиальных опухолей яичников. Все случаи классифицировали по TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового союза (UICC, версия 1998 г.). Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток проводился гистологический анализ микросрезов (толщина 5 мкм) после их окрашивания эозином и гематоксилином, что позволяло получить в исследуемом материале не менее 70% опухолевых клеток. Образцы тканей хранили при -70°C . В качестве дополнительного контроля использовали по пять образцов тканей молочной железы и яичников, полученных от доноров без онкологических заболеваний в анамнезе. ДНК из ткани выделяли по стандартной методике [4]. Работа проведена на базе Государственного Научного Центра РФ ГосНИИ генетика.

Анализ метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* методом метилчувствительного рестриктазного анализа (МЧРА) с использованием набора ферментов выполнен по аналогии с методом, предложенным ранее [4]. Метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований и оставлять не гидролизованными участки, содержащие 5-метилцитозин. В соответствии с рестриктной картой промоторных CpG-островков исследованных генов применяли от двух до четырех метилчувствительных рестриктаз, фирмы «Fermentas»: *HpaII* (CCGG) *HhaI* (CGCG), *SsiI* (CCGC), и *Bsh1236I*

(CGCG). Расщепление ДНК рестриктазами *HhaI* и *HpaII* проводили в буфере Y, *Bsh1236I* – в буфере R, *SsiI* – в буфере O, фирмы «Fermentas». В качестве матрицы для ПЦР использовали парные образцы ДНК опухолевой и условно нормальной ткани до и после обработки ферментом. В качестве контроля сохранности ДНК (K2) использовали продукт ПЦР фрагмента экзона 1 гена *RARβ2* (229 п.н.), т.к. этот фрагмент не содержит участков узнавания указанных рестриктаз. Полноту расщепления образцов ДНК ферментами проверяли с помощью амплификации фрагмента гена β -3А-адаптина (445 п.н.) (K1), который содержит неметилированные участки узнавания рестриктаз *HpaII*, *HhaI*, *SsiI* и *Bsh1236I* (как в норме, так и в опухоли).

Праймеры и условия ПЦР приведены в табл. 1. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-HCl, pH 9,3; 16,7 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% твин-20; 1,5–2,5 мМ MgCl_2 ; 0,25 мМ каждого dNTP; 25 пМ каждого праймера; 1 ед. Hot Start Taq ДНК полимеразы, фирмы «СибЭнзим»; 5–20 нг ДНК пробы. Амплификацию проводили по следующей программе: 95°C – 2 мин; 35 циклов (93°C – 20 с, $T_{\text{отж}}$ – 30 с, 72°C – 20 с) и 72°C – 4 мин. ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (Россия). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле.

Статистический анализ проводился с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». При анализе достоверности полученных данных был использован точный критерий Фишера. Достоверность считалась значимой, если $p \leq 0,05$ [23].

Результаты и обсуждение

Важно отметить, что клиническая информация для всех анализируемых групп больных не была известна до окончания изучения, которое показало, что из 59 изученных образцов РМЖ 12 принадлежали пациенткам с ПМЗО, а из 50 образцов РЯ – 5 были с ПМЗО, одной из которых был РЯ.

Изучение метилирования ДНК в опухолях молочной железы и яичников проводилось с использованием МЧРА, что позволило не только более полно определить долю образцов, в которых эти гены метилированы, но и оценить плотность метилирования CpG островка в каждом образце.

Анализ метилирования промоторного района гена *RASSF1A* при РМЖ и РЯ

На рис. 1 приведены типичные примеры анализа метилирования промоторного района гена *RASSF1A* с помощью МЧРА при РМЖ и РЯ.

Согласно полученным данным частота метилирования гена *RASSF1A* в опухолях молочной железы и яичников достоверно выше, чем в гистологически нормальной ткани ($p \leq 0,05$) (табл. 2). Частота метилирования гена *RASSF1A* при РМЖ и РЯ составила 78 % (46/59) и 72 % (36/50) соответственно, что почти вдвое превышает литературные данные (40 %) [13]. Наблюдаемые различия в метилировании гена *RASSF1A* могут быть связаны главным образом с чувствительностью метода и с этнографическими особенностями исследуемых популяций. Различия в плотности метилирования CpG-пар, были менее выражены и, согласно данным МЧРА, достоверны только при раке молочной железы ($p = 1,0 \times 10^{-7}$) (см. табл. 2). В то же время метилирование промоторного района гена *RASSF1A* в ДНК, из тканей молочной железы и яичников, полученных от пяти без онкологических заболеваний в анамнезе доноров, выявлено не было.

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры и условия ПЦР, использованные при анализе метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *RAR-β2* и *SEMA3B* методом МЧРА

Маркер	Структура праймеров	T _{отж} /Mg, mM	Продукт ПЦР, п.н.
K1*	TGCCCTCTGGACTGGAACCT CCTGAGCCCAGCCCAAGTC	64 °C 1,5	445
K2**	AGAGTTTGATGGAGTTGGGT CATTCGGTTTGGGTCAATCC	62 °C 1,5	229
RASSF1A	GTAAAGCTGGCCTCCAGAAACACGG GCAGCTCAATGAGCTCAGGCTCCCC	65 °C 2,5	357
RARβ2	ATTTGAAGGTTAGCAGCCCG CATTCGGTTTGGGTCAATCC	56 °C 1,5	680
SEMA3B	TTGAGATATTGGAGTCCACGGGTG CAGTGTGGCCTGGAAGACCTC	56 °C 1,5	450

*K1 – контроль полноты гидролиза ДНК, фрагмент гена *β-3A-адантина* (ID Gen Bank AF247736.2.);

** K2 – контроль сохранности ДНК, фрагмент экзона 1 гена *RARβ2*

Таблица 2

Частота и плотность метилирования промоторного района гена *RASSF1A* при РМЖ и РЯ по данным МЧРА*

Вид рака	Частота метилирования**	Плотность метилирования***
<i>P=</i>	$5,9 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-7}$
РМЖ	опухоль	46/59, 78%
	норма	21/59, 36%
<i>P=</i>	$1,11 \times 10^{-9}$	0,1415
РЯ	опухоль	36/50, 72%
	норма	6/50, 12%

*Рассчитано на основании данных по 59 образцам РМЖ и 50 образцам РЯ.

**Частота метилирования – доля образцов, в которых выявлено метилирование.

***Плотность метилирования – доля метилированных CpG-пар локуса в группе исследованных образцов. За 100 % принято произведение числа CpG в локусе на число исследованных образцов, в которых выявлено метилирование.

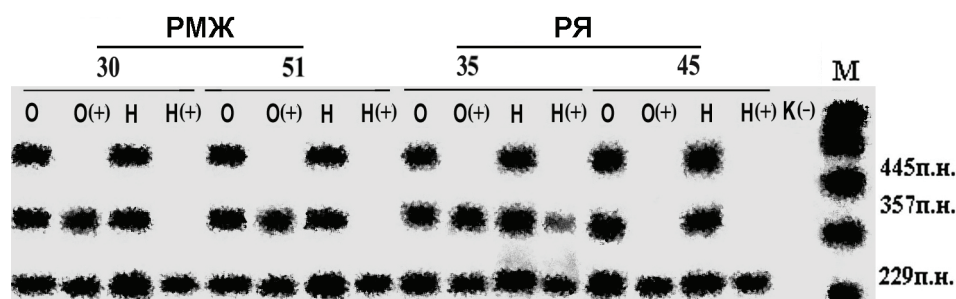


Рис. 1. Применение метода МЧРА для анализа метилирования промоторного района гена *RASSF1A*. Электрофоретическое разделение в 2%-ном агарозном геле продуктов ПЦР ДНК до и после (+) гидролиза рестриктазой *SsiI*. K(-) - отрицательный контроль (в отсутствие ДНК). M – маркер с шагом 100 п.н. (100 bp DNA ladder).

№ Образца	МЧРА						
	1	4	5	6	11	14	15
Опухоль	20						
	25						
	30						
	36						
	47						
Норма	20						
	25						
	30						
	36						
	47						

Рис. 2. Схематическое изображение метилирования промоторного района гена *RARβ2* в 5 образцах РЯ по данным МЧРА. Черный прямоугольник – метилирование выявлено, белый прямоугольник – метилирование не выявлено. Сверху позиции CpG-динуклеотидов; с левого края приведены номера образцов РЯ.

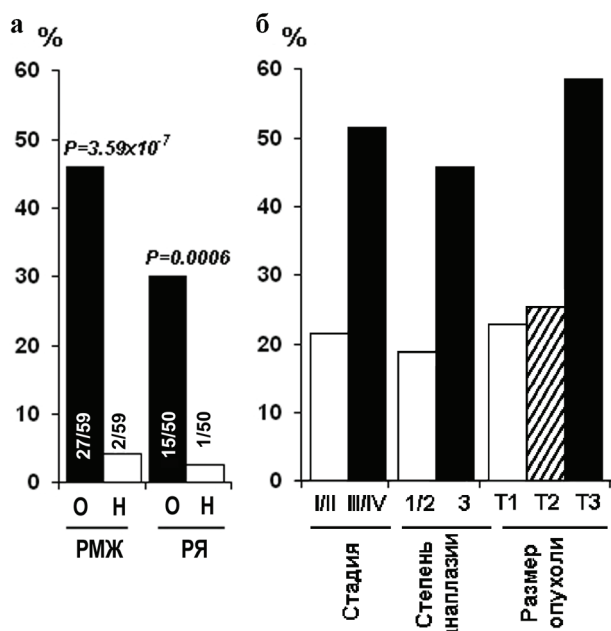


Рис. 3. Особенности гена *RARβ2* при первичных опухолях РМЖ и РЯ. Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера ($P \leq 0.05$).

А: частота метилирования промоторного CpG-островка (образцы ДНК первичных опухолей РМЖ и РЯ).

Б: связь частоты метилирования с прогрессией опухолей.

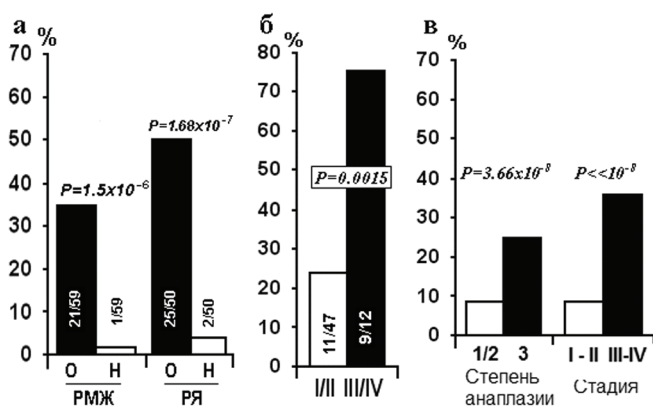


Рис. 4 Особенности гена *SEMA3B*. Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера.

А: частота метилирования дистального промоторного CpG-островка (образцы ДНК первичных опухолей РМЖ и РЯ).

Б: корреляция частоты метилирования с клинической стадией при РМЖ.

В: корреляция плотности метилирования промоторного CpG-островка со степенью анаплазии и с клинической стадией при РМЖ.

Все это позволяет считать метилирование этого гена ранним событием в патогенезе РМЖ и РЯ и может быть использовано как молекулярный маркер злокачественной трансформации. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, указывающими на то, что эпигенетические изменения ДНК в промоторной области гена *RASSF1A* в опухоли возникают раньше, чем структурные изменения ДНК и морфологические изменения в ткани [1; 4; 8; 17].

В нашей работе, выполненной на представительной выборке (59 образцов РМЖ и 50 РЯ), не найдено статистически достоверной зависимости частоты метилирования промоторной области гена *RASSF1A* от стадии, степени анаплазии и метастазирования опухолей ($p=0.3-1.0$, данные не приведены). Отсутствие связи с прогрессией согласуется с заключением о том, что метилирование *RASSF1A* — одно из ранних событий в патогенезе РМЖ и РЯ.

Анализ метилирования промоторного района гена *RARβ2* при РМЖ и РЯ

Методом МЧРА с использованием 3-х метилчувствительных рестриктаз *HpaII*, *SsiI* и *Bsh1236I* суммарно тестировали 7 CpG-динуклеотидов (1, 4, 5, 6, 11, 14 и 15, рис. 2). Из них 3 CpG пары исследованы *HpaII* (1, 11 и 15), 4 и 14 — *SsiI* и 5 и 6 — *Bsh1236I*.

В качестве примера на рис. 2 приведены результаты анализа метилирования 5 парных образцов ДНК РЯ.

Проведенный нами анализ показал (рис. 3, А), что частота метилирования промоторного района гена *RARβ2* составляет 46 % (27/59) при РМЖ и 30 % (15/50) при РЯ, и статистически достоверно отличается от таковой в гистологически нормальной ткани ($p < 0.05$).

У пациенток с ПМЗО метилирование этого гена выявлено в 67 % (8/12) образцов с поражением молочной железы и у 80 % (4/5) — с поражением яичника. Наличие метилирования промоторной области гена *RARβ2* в некоторых образцах ДНК гистологически нормальной ткани молочной железы и яичников пациентов, выявляемое с частотой 2–4 % означает, что эта модификация может происходить в начале онкогенеза, предшествуя структурным изменениям в ДНК тканей пациентов. В то же время метилирование промоторного района гена *RARβ2* в дополнительном контроле обнаружено не было. Нами также была показана связь частоты изменения метилирования промоторного района гена *RARβ2* со стадией, степенью анаплазии и размером опухоли при РМЖ ($p \leq 0.05$) (рис. 3, Б). Другими авторами метилирование промоторной области данного гена было обнаружено в предраковых образованиях, а частота метилирования возрастала с образованием злокачественных опухолей и с прогрессией заболевания [12; 16].

Анализ метилирования промоторного района гена *SEMA3B* при РМЖ и РЯ

Методом МЧРА с использованием 2-х метилчувствительных рестриктаз *HpaII* и *SsiI* было проанализировано 59 парных образцов РМЖ и 50 РЯ. Проведенный анализ показал, что метилирование гена *SEMA3B* выявляется в 36 % случаев РМЖ (21/59) и в 50 % образцах РЯ (25/50) (рис. 4, А). Кроме того, обнаружено, что промоторная область гена *SEMA3B* достоверно чаще метилирована в ДНК опухоли, чем в ДНК соответствующей гистологически нормальной ткани той же пациентки ($p \leq 0,05$) и не было обнаружено в дополнительном контроле.

У пациенток с первично-множественным раком частота метилирования гена *SEMA3B* в 33 % (4/12) образцов с РМЖ и в 60 % (3/5) образцов с РЯ. Кроме того, показано, что промоторная область гена *SEMA3B* достоверно чаще метилирована в ДНК опухоли, чем в ДНК гистологически нормальной ткани молочной железы или яичников ($p \leq 0,05$ по Фишеру) (рис. 4, А). В то же время, метилирование промоторного района гена *SEMA3B* в дополнительном контроле выявлено не было. Эти данные указывают на функциональное значение и специфичность метилирования промоторной области этого гена в онкогенезе изучаемых опухолей. Выявлена достоверная корреляция частоты метилирования промоторного района гена *SEMA3B* с клинической стадией при РМЖ ($p < 0,05$) (рис. 4, Б). Нами рассчитана плотность метилирования CpG-островка гена *SEMA3B* (сумма метилированных CpG относительно суммы исследованных CpG в 21 образце ДНК первичных опухолей РМЖ и 25 образцах РЯ, в которых выявлено метилирование). Показана достоверная корреляция плотности метилирования со степенью злокачественности и стадией при РМЖ ($p < 10^{-6}$ по Фишеру; рис. 4, В).

Данные по метилированию гена *SEMA3B* ранее были получены только для немелкоклеточного рака легкого, раке печени и желчного пузыря и нейробластомы. [19; 20; 21; 22].

Высокая частота метилирования в образцах ДНК опухолей и феномен выявления метилирования в нормальной ткани у пациентов с РМЖ и РЯ (еще до возникновения морфологических изменений) может указывать на связь метилирования гена *SEMA3B* с началом онкогенеза, что важно для использования этого теста в качестве маркера при комплексной диагностике рака.

Литература

1. Брага Э.А., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р. От идентификации геномных полиморфизмов к диагностическим и прогностическим маркерам эпителиальных опухолей человека // Молекулярная Биология. – 2004. – 38. – С. 179–90.
2. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. – Санкт-Петербург, 2007. – 211 с.
3. Казубская Т.П., Белев Н.Ф., Нефедов М.Д. и др. Клинико-генетический анализ первично множественных злокачественных новообразований // Российский онкологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 4–9.
4. Логинов В.И., Маликова А.В., Серегин Ю.А. и др. Уровень метилирования гена *RASSF1A* в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников // Молекулярная биология. – 2004. – № 38. – С. 654–67.
5. Попова Т.Н., Федоров В.Э., Харитонов Б.С. Первично-множественные синхронные злокачественные новообразования пищеварительной системы // Медицинский альманах. – 2011. – № 5. – С. 76–9.
6. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2010 г. под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2011. – Т. 19 (прил. 1).
7. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. – 260 с.
8. Angeloni D. Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease // Brief. Funct. Genomic Proteomic. – 2007. – 6(1). – P. 19–39.

Анализ метилирования генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* в ПМЗО с РМЖ и/или РЯ

Нами впервые показана значимо более высокая частота метилирования гена *RASSF1A* при ПМЗО в сравнении с солитарными опухолями. Так, частота метилирования промоторной области гена *RASSF1A* в ПМЗО при РМЖ составила 90 % (11/12). Причем у 6 пациенток, наблюдался билатеральный РМЖ, а у других 5 – одной из первых опухолей был РМЖ. Метилирование гена *RASSF1A* также выявлено в 90 % (4/5) среди больных с ПМЗО, у которых одной из первых опухолей был рак яичников. Для всех пациенток с ПМЗО метилирование гена *RASSF1A* была найдено и в гистологически нормальной ткани. Метилирование гена *RARβ2* выявлено в 67 % (8/12) образцов с поражением молочной железы и у 80 % (4/5) – с поражением яичника. У пациенток с первично-множественным раком частота метилирования гена *SEMA3B* обнаружена в 33 % (4/12) образцов с РМЖ и в 60 % (3/5) образцов с РЯ. Таким образом, показано повышение частоты метилирования в ПМЗО и с РМЖ, и с РЯ у всех 3 исследованных генов супрессоров по сравнению с данными, представленными в табл. 2 и на рис. 3, А и 4, А. Причем частота метилирования гена *RARβ2* при ПМЗО с РЯ была достоверно выше ($p = 0,0434$), чем при обычном РЯ. В литературе высокая частота метилирования при первично-множественном раке также была выявлена при изучении плоскоклеточного рака полости рта [11].

Заключение

Изучение статуса метилирования генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* показало, что эпигенетическое изменение промоторных областей этих генов может быть одним из последовательных молекулярных изменений при РМЖ и РЯ, а метилирование *RASSF1A* и *RARβ2* коррелирует с тенденцией к развитию ПМЗО в молочной железе и яичниках. Возможно, метилирование ДНК является одной из причин возникновения ПМЗО у пациенток с РМЖ и РЯ. Выявленные особенности эпигенетических изменений генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* могут быть использованы, как с целью ранней диагностики РМЖ (*RASSF1A*), так и в качестве новых прогностических тестов (*SEMA3B* и *RARβ2*), и позволят выделить группы риска больных по развитию РМЖ и РЯ, как солитарных, так и ПМЗО.

9. *Belinsky S.A., Nikula K.J., Palmisano W.A. et al.* Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and potential biomarker for early diagnosis // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1998. – 95(20). – P. 11891–6.
10. *Capen CC.* Mechanisms of hormone-mediated carcinogenesis of the ovary // *Toxicol Pathol*. – 2004. – 32(Suppl 2). – P. 1–5.
11. *Czerninski R., Krichevsky S., Ashhab Y. et al.* Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, *hMLH1* and *hMSH2* in oral squamous cell carcinoma // *Oral Diseases Oral Dis*. – 2009. – 15(3). – P. 206–13.
12. *Feng W., Shen L., Wen S. et al.* Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers // *Breast Cancer Res*. – 2007. – 9(4). – P. 1–13.
13. *Dammann R., Schagdarsurengin U., Seidel C. et al.* The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update // *Histol Histopathol*. – 2005. – 20(2). – P. 645–66.
14. *Dammann R., Li C., Yoon J.H. et al.* Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3 // *Nat Genet* 2000. – 25. – P. 315–9.
15. *Gadducci A., Cosio S., Gargini A., Genazzani A.R.* Review Sex-steroid hormones, gonadotropin and ovarian carcinogenesis: a review of epidemiological and experimental data. Review// *Gynecol Endocrinol*. – 2004. – 4. – P. 216–28.
16. *Jing F., Yuping W., Yong C. et al.* CpG island methylator phenotype of multigene in serum of sporadic breast carcinoma // *Tumour Biol*. – 2010. – 4. – P. 321–31.
17. *Kuroki T., Trapasso F., Yendamuri S. et al.* Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of Semaphorin 3B in non-small cell lung cancer // *Cancer Res*. – 2003. – 63. – P. 3352–5.
18. *Lerman M.I., Minna J.D.* The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium // *Cancer Res*. – 2000. – 60(21). – P. 6116–33.
19. *Marsit C.J., Houseman E.A., Christensen B.C. et al.* Examination of a CpG island methylator phenotype and implications of methylation profiles in solid tumors // *Cancer Res*. – 2006. – 66(21). – P. 10621–29.
20. *Nair P.N., McArdle L., Cornell J. et al.* High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene // *Cancer Genet. Cytogenet*. – 2007. – 174. – P. 100–10.
21. *Riquelme E., Tang M., Baez S. et al.* Frequent epigenetic inactivation of chromosome 3p candidate tumor suppressor genes in gallbladder carcinoma // *Cancer Lett*. – 2007. – 250. – P. 100–6.
22. *Tischhoff I., Markwarth A., Witzigmann H. et al.* Allele loss and epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors // *Int. J. Cancer*. – 2005. – 115. – P. 684–9.
23. *Weir B.S.* Mathematical analysis of DNA sequences // *Genome*. – 1989. – 31(2). – P. 1093–4.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.716.1-089.23:611.018.4

¹Алексеева И.С., ¹Кулаков А.А., ^{2,3}Гольдштейн Д.В., ^{1,2}Волков А.В., ¹Шураев А.И.**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ
ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ОБЪЕМА КОСТНОЙ ТКАНИ
НА ВЕРХНЕЙ ЧЕЛЮСТИ (СРОК НАБЛЮДЕНИЯ ДО 21 МЕСЯЦА)**¹ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Минздрава России», Москва²ЗАО «РеМетэкс», Москва³УРАМН «Медико-генетический научный центр РАМН», Москва**Контактная информация**

Алексеева Ирина Сергеевна, канд. мед. наук, врач клиники «Дента Эль»

Адрес: Москва, Хорошевское ш., 68, тел. +7(916)653-11-26

E-mail: shuraev.alex777@gmail.com

Статья поступила: 11.02.2012, принята к печати 29.02.2012.

Изучение механизмов регенерации различных органов и тканей с использованием клеточных технологий получило значительное развитие за последнее десятилетие. Возросло количество исследований по использованию стволовых клеток для устранения дефектов костной ткани в хирургической стоматологии. Проведено клиническое исследование по восстановлению костной ткани у пациентов с выраженной атрофией альвеолярного отростка верхней и нижней челюстей с помощью тканеинженерных конструкций. Источником мультипотентных стромальных клеток для изготовления тканеинженерной конструкции была жировая ткань. Для изучения характеристик полученного костного регенерата через 4 мес. после проведения трансплантации мы проводили гистологическое исследование.

Ключевые слова: жировая ткань, липоаспират, стромальные клетки, тканевая инженерия, костная ткань.¹Alekseeva I.S., ¹Kulakov A.A.^{2,3}, ¹D. Goldstein^{1,2}, ¹AV Volkov^{1,2}, ¹Shuraev A.**EXPERIENCE OF CONSTRUCTION TKAINEINZHENERNOY
TO INCREASE THE VOLUME OF BONE****On the upper jaw (TERM MONITORING TO 21 MONTHS)**¹FGU "TsNIIS and Maxillofacial Surgery Health Ministry of Russia", Moscow²ZAO "ReMeTeks", Moscow³URAMN "Medical Genetics Research Center", Moscow

Investigation of the mechanisms of regeneration of various organs and tissues using cellular technology has developed considerably over the last decade. Increased number of studies on the use of stem cells to correct defects in bone tissue dental surgery. Adipose tissue was used as a source of multipotent stem cells to produce tissue engineering. It was a clinical study on the restoration of bone tissue in patients with severe atrophy of the alveolar process of the maxilla with tissue engineering. To study the characteristics of the obtained bone regenerate within 4 months after transplantation examined histologically.

Key words: adipose tissue, lipoaspirat, multipotent stem cells, tissue engineering, bone tissue.**Введение**

Восстановление костной ткани с помощью ТИК вызывает большой интерес исследователей и клиницистов [2; 4; 7; 8]. Первый этап создания ТИК включает в себя эксфузию аутогенного клеточного материала, выделение тканеспецифических клеток и получение их культуры. Далее производится дифференцировка культуры малодифференцированных клеток в необходимом направлении. Эквиваленты костной ткани получают путем направленной дифференцировки стволовых клеток костного мозга, надкостницы, жировой ткани [5; 6; 9–12]. Затем культура клеток помещается на носитель (матрицу).

Далее конструкция вводится в зону дефекта [1; 3]. При культивировании клеток для получения объема, необходимого для успешной стимуляции остеогенеза, как правило, используется не более 4–6 пассажей, что позволяет получить достаточное количество клеточного материала для трансплантации.

В зависимости от индивидуальных способностей организма на это требуется от 3 до 5 недель. Клетки, культивированные до 10 пассажей, считаются безопасными для клинического применения [11; 13].

С 2006 по 2011 год на базе ФГУ «ЦНИИС» Росмедтехнологий совместно с ЗАО «РеМетэкс» в соответствии с решением Ученого совета и этического комитета ФГУ «ЦНИИС» Росмедтехнологий проводилось клиническое исследование по восстановлению костной ткани у пациентов с выраженной атрофией альвеолярного отростка в области верхней и нижней челюсти с помощью тканеинженерных конструкций на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ). В рамках клинического исследования было проведено лечение 20 пациентов.

Материалы и методы

Для создания ТИК использовали культуру мультипотентных стромальных клеток СВФ ЖТ. СВФ ЖТ выделяли из аутолипоасpirата пациентов. Липоаспирацию проводили по стандартной методике под местной инфильтрационной анестезией в области передней брюшной стенки.

Объем липоасpirата рассчитывали, исходя из предполагаемого объема ТИК, а также с учетом объема, который подвергался криоконсервированию.

В зависимости от этих факторов объем липоаспирата составлял 20-60 мл. Липоаспират промывали раствором Версена и дезагрегировали путем инкубации в нем с добавлением 0,25 %-ного трипсина при 37 °С в течение 1,5 часов. Клеточную суспензию центрифугировали 10 минут при 1100 об/мин, осадок разводили ростовой средой (DMEM/F12 1:1 с добавлением аутологичной сыворотки до 10%, амикацина до 500 мг/л), переносили в чашки Петри и инкубировали при стандартных культуральных условиях (37 °С, 5% CO₂).

Плотность посева составляла 1,5-2 тыс. клеток на см². Спустя двое суток не прикрепившиеся клетки удаляли, заменяя ростовую среду на свежую. По достижении 80 %-ного конфлюентного монослоя клетки рассеивали в новую культуральную посуду в плотности 1,5-2 тыс. клеток на см². Ростовую среду меняли каждые 3 суток.

Для направленной остеогенной дифференцировки клетки рассаживали на 90 мм чашки Петри и по достижении 80 %-ного конфлюентного монослоя заменяли ростовую среду на дифференцировочную (DMEM с 10% аутологичной сыворотки крови, 100 мкг/мл амикацина, 50 мг/л L-аскорбиновой кислоты, 10 мМ/л β-глицерофосфата натрия и 10 нМ 1,25-дигидроксивитамина D3). Замену среды на свежую производили каждые 3 суток.

Приготовление PRP

(плазмы, обогащенной тромбоцитами)

Забор крови проводили в вакуумную систему типа Vacuette® с цитратом натрия. Кровь центрифугировали при скорости 1000 об/мин в течение 10 мин, отбирали верхний слой (без эритроцитов) и центрифугировали его при скорости 3600 об/мин в течение 10 мин. Большую часть супернатанта удаляли, осевшие тромбоциты ресуспендировали в оставшейся плазме.

Подготовка

такнеинженерной конструкции к трансплантации

В качестве носителя использовали «Остеоматрикс» в виде блоков и костной крошки (ООО «Конектбиофарм»). После отмывания блоков раствором Хэнкса («ПанЭко») с цефазолином (ОАО «Синтез») (1г/л) на них аккуратно наслаивали PRP, содержащую 7×10⁶ клеток в см³, и по каплям добавляли раствор тромбина ("P.Z. Cormay") 50 Ед/мл на 10 %-ном р-ре хлорида кальция (ОАО «Дальхимфарм») до полимеризации.

Гистологические методы

Для изучения характеристик костного регенерата через 4 месяца после проведения трансплантации проводили гистологическое исследование. Образцы тканей забирались 2 мм трепаном в виде столбиков. Забор образцов тканей проводился перед формированием ложа для установки дентального имплантата.

Биопсийный материал, полученный от пациентов во время дентальной имплантации, помещали в забуференный нейтральный 10 %-ный формалин (Biooptica, Italy) и фиксировали 24 часа.

Образцы для гистологического исследования представляли собой столбики костной ткани 3 мм в диаметре и длиной от 8 до 10 мм.

Фиксированный материал промывали проточной водой в течение 24 часов. Затем проводили кислотную декальцинацию с использованием смеси соляной и муравьиной кислот (Biooptica, Italy) в

течение 6 часов, после чего проводилась промывка образцов в фосфатном буфере (pH=7,4). Для получения серийных срезов материал обезвоживали и заливали в парафин.

Для проведения гистоморфометрического исследования из серии срезов случайным образом с помощью программного обеспечения Random выбирали 6 стекол, содержащих 4 среза. 5 стекол окрашивали по Массону–Голднеру, 1 – гематоксилином по Мейеру с докраской эозином.

Для морфометрического анализа выбирали третий слева срез. Если его качество было недостаточно высоким, выбирали следующий.

С помощью этого метода рандомизации достигалась максимально случайная выборка объекта исследования.

Клинический пример 1 (рис. 1; см. вкл.)

Пациентка Р., 51 года.

Диагноз: «вторичная частичная адентия на верхней и нижней челюсти, хронический генерализованный пародонтит тяжелой степени тяжести».

Осмотр: подвижность 16; 17; 27; 13; 12; 11 – 3 степени.

КТ: атрофия альвеолярного отростка, измененная периодонтальная щель в области 27; 11; 12; 13; 16; 17. Утолщение слизистой верхнечелюстных пазух. Высота альвеолярного отростка до трансплантации области отсутствующих зубов: 14 – 2 мм; 15 – 2,6 мм; 25 – 0,9 мм; 26 – 0,9 мм.

Лечение. А: Экстракция 16; 17; 27; 13; 12; 11.

Б: Операция. Двухсторонний синус-лифтинг ТИК ЖТ (лунки удаленных зубов заполнены тканеинженерной конструкцией). V трансплантата 9 см³. Был перемещен полнослойный слизисто-надкостничный лоскут в области удаленных зубов, рана ушита наглухо. На период подготовки к имплантации изготовлен временный съемный протез на верхнюю челюсть.

В: Имплантация. Через 4 месяца после трансплантации ТИК ЖТ по данным КТ высота альвеолярного гребня составила: 14 – 6,5 мм; 15 – 11,1 мм; 16 – 9 мм; 17 – 8 мм; 25 – 11,5 мм; 26 – 10,7 мм. В альвеолярных бухтах с 2 сторон участки сформированной костной ткани, сливающейся с костной тканью альвеолярного отростка, по плотности соответствующей неизменной костной ткани. Через 4 мес. после трансплантации проведена имплантация с установкой 8 имплантатов Bicon ø: 17; 15; 25; 25 – 4,5 на 8 мм, 13 и 23 – 4,0 на 8 мм и 11; 21 – 3,5 на 8 мм. Все имплантаты были заглублены на 2 мм.

Осложнение. В области имплантата, установленного в проекции 17; 2 нед. сохранялся болевой симптом и выраженный отек слизистой. Расхождение швов не было. Швы сняты через 7 дней. Через 4 мес. после раскрытия имплантата для установки формирователя десны была выявлена подвижность имплантата в области 17 – имплантат удален.

Гистология. В материале из регенерата, обнаружена формирующаяся костная ткань (рис. 3).

Обследование. Через 12 мес. после внутрикостной имплантации и 16 мес. после трансплантации ТИК ЖТ КТ: в области проведенной трансплантации видна неизменная костная ткань.

Клинический пример 2 (рис. 4; см. вкл.)

Пациент Б., 1953 лет

Жалобы: обратился на затрудненное пережевывание пищи из-за адентии 16; 14.

КТ: Дефект костной ткани в области вестибулярной кортикальной пластинки в проекции отсутствующего 16 зуба, медиальной стенки корня 17 зуба,

далее дефект распространялся в область дна верхнечелюстной пазухи, снижение высоты альвеолярного отростка в области дна верхнечелюстной пазухи: 16 зуба – 1 мм, толщина костной ткани от верхушки 15 до нижней стенки пазухи около 2 мм.

Лечение: А: Удаление 17.

Б: Операция. открытый синус-лифтинг. В область дна верхнечелюстной пазухи введена ТИК ЖТ, костный дефект и лунка 17 зуба также заполнены тканеинженерной конструкцией. V трансплантата – 4 см³.

В: Имплантация. Через 4 месяца на КТ высота костной ткани в области отсутствующих зубов: 16 – 16 мм, 17 – 14 мм, от верхушки корня 15 – 6 мм. В альвеолярной бухте и зоне удаленных зубов, сформированная костная ткань, сливающаяся с костной тканью альвеолярного отростка, по плотности соответствующая неизменной костной ткани. Пациенту были установлены 3 имплантата Viscon Ø 4,5 на 11 мм в области отсутствующих зубов – 14; 16; 17.

Гистология. В материале из регенерата, обнаружена формирующаяся костная ткань (рис. 5).

Обследование. Через 21 мес. после трансплантации ТИК ЖТ и 17 мес. после имплантации.

КТ: параметры костной ткани не изменены.

Морфологически через 120 дней после трансплантации ТИК ЖТ: образцы состояли из трех зон, материнской кости, промежуточной и зоны регенерата (рис. 5). Зона материнской кости состоит из 2 параллельных пластинок компактной кости с прослойкой губчатой кости между ними, содержащей желтый костный мозг и незначительное количество красного костного мозга.

Зона, содержащая тканеинженерную конструкцию, состоит преимущественно из новообразованной трабекулярной костной ткани, ее относительная объемная доля составила 39,3%. Рыхлая волокнистая соединительная ткань с красным и желтым костным мозгом занимает основной объем межтрабекулярного пространства и составляет 37%. Относительная доля ткани (8 %) и депозитов фибрина (2,5 %) занимает незначительную часть костного регенерата.

Заключение

Результаты многих исследований по применению ТИК на основе МСК являются предварительными, и, тем не менее, методы тканевой инженерии, направленные на восстановление костной ткани, являются малоинвазивными и позволяют получить предсказуемый результат, расширяя, тем самым, возможности проведения костнопластических вмешательств.

Ни в одном из опубликованных клинических исследований по устранению дефектов костной ткани с использованием МСК не отмечалось побочных эффектов, таких как воспаление или чрезмерный рост ткани.

Таким образом, разработка методов восстановления костных дефектов с использованием МСК ЖТ может стать эффективным и наиболее перспективным решением сложной клинической задачи по восстановлению костной ткани и стимуляции репаративного остеогенеза.

Литература

1. Волков А.В. Тканевая инженерия: новые перспективы развития медицины. – клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – №1, 2005. – с. 57–64.
2. Athanasiou K. A., C. Zhu, D. R. Lantot, C. M. Agrawal, andx. Wang. Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. – tissue eng. 2000. 6: 361–81.
3. C. D. Helgason and c. L. Miller (edited by). Methods in molecular biology, vol. 290: basic cell culture protocols, p. 173–85. Third edition.: © humana press inc., totowa, nj.
4. Jiang H., Xiaohua L., Peter X. Biomineralization and bone regeneration. Principles of regenerative medicine (second edition), 2011. P. 733–45.
5. Kassem M., Abdullah B.M., Saeed H. Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. – arch. Biochem. Biophys. – 2008, may 15;473(2): 183–7.
6. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter Z., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. – stem cells. – 2006; 24: 1294–301.
7. Kuhbier J.W., Weyand B., Sorg H., Radtke C., Yogi P.M., Reimers K. Stem cells from fatty tissue: a new resource for regenerative medicine? – chirurg. – 2010 sep;81(9): 826–32.
8. Kwan M.D., Slater B.J., Wan D.C., Longaker M.T. Cell-based therapies for skeletal regenerative medicine. – hum. Mol. Genet. – 2008;17: p. 93–8.
9. Muscler G.F., Nacamoto C., Griffith L.G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. – j. Bone joint surg. Am. – 2004; 86-a(7): 1541–58.
10. Lee J.A., Parrett B.M., Conejero J.A. Et al. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. – ann. Plast. Surg. 2003; 50(6): 610–7.
11. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D. Et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284(5411): 143–7.
12. Rose F.R., Oreffo R.O. Bone tissue engineering: hope vs hype. Biochem biophys res commun. 2002; 292: 1–7.
13. Rubio D., Garcia-castro J., Martin M.C., De La Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. – cancer research. – 2005; 65(8): 3035–9.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 618.19-006.6-085. 277.3

О.И. Костылева, А.В. Масляев, Ю.В. Крюк, А.А. Тулеуова, У.Р. Мамедов, О.М. Кузнецова, И.В. Терешкина

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА

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

Контактная информация:

Костылева Ольга Ивановна к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической биохимии НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)-324-11-59

E-mail: biokhimia@mtu-net.ru

Статья поступила: 29.01.2012, принята к печати 29.02.2012.

Резюме

Система реализации эффектов ИФР помимо самих ИФР-лигандов включает рецепторы и связывающие белки, которые образуют сложно регулируемую сеть взаимодействий как между собой, так и с другими биологическими регуляторами роста и выживаемости клеток. ИФР-сигнальный путь участвует в активации каскада митоген-активируемых протеинкиназ и сигнального каскада, ключевыми компонентами которого являются фосфатидилинозитол-3 киназа (PI-3K) и серин-треониновая протеинкиназа Akt, что приводит в итоге к ингибированию апоптоза и стимуляции пролиферации клеток. В молочной железе ИФР-1 обнаруживается главным образом в нормальных стромальных клетках, ИФР-2 также определяется преимущественно в клетках стромы, однако может быть обнаружен и в злокачественном эпителии молочной железы. Высокий уровень экспрессии ИФР-2 ассоциируется с плохим прогнозом при РМЖ, а повышенный уровень ИФР-1 в крови является независимым фактором риска РМЖ у женщин в пременопаузе. В качестве мишени таргетной противоопухолевой терапии, имеет смысл рассмотреть множественное воздействие на ИФР-сигнальный путь, в частности, редукцию и нейтрализацию ИФР-лиганда, подавляющую регуляцию и конкурентное связывание с ИФР-рецептором, а также развитие ИФР-независимых антагонистических стратегий.

Ключевые слова: ИФР, рецепторы ИФР, ИФР-связывающие белки, рак молочной железы, таргетная противоопухолевая терапия.

O.I. Kostyleva, A.V. Maslyaev, Yu.V. Kruk, A.A. Tuleuova, U.R. Mamedov, O.M. Kuznetsova, I.V. Tereshkina,

BREAST CANCER AND IGF

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

Abstract

IGF system includes IGF ligands, IGF receptors and IGF binding proteins, which interact widely with some other biological regulators of cell proliferation and growth. IGF signaling pathway activates mitogen activated protein kinases cascade and PI-3K and Akt cascades, which inhibit apoptosis and stimulate cell proliferation. IGF are found mostly in stromal cells in breast tissue. High level of IGF-2 expression associates with poor prognosis in breast cancer, and increased circulating IGF-1 level is an independent rescue factor of breast cancer in premenopause. As a target for antitumor therapy could be perspective to try multiple action on IGF signaling pathway, including reduction and neutralization of IGF ligand, which downregulates IGF binding to receptors, and also developing of IGF independent antagonistic strategies.

Key words: IGF, IGF receptors, IGF binding proteins, breast cancer, antitumor target therapy.

Введение

Система реализации эффектов ИФР помимо самих ИФР-лигандов включает рецепторы и связывающие белки, которые образуют сложно регулируемую сеть взаимодействий как между собой, так и с другими биологическими регуляторами роста и выживаемости клеток [33]. Клеточные эффекты ИФР опосредуются двумя типами специфических ИФР рецепторов, а также рецепторами инсулина и гибридным рецептором, связывающим как инсулин, так и ИФР-1 [4]. ИФР рецептор 1 типа (ИФР-Р1) является медиатором первичного ответа всех ИФР, экспрессируется во всех типах клеток кроме гепатоцитов и Т-лимфоцитов и служит важным элементом обеспечения нормального роста и развития организма. Эмбрионы мышей, лишенные ИФР-Р1, имеют дефекты развития легких, кожи, костей, неврологические нарушения [29]. ИФР-Р1 также вовлечен в злокачественный рост [14; 24]. Он представляет собой гликозилированный гетеротетрамер, состоящий из двух экст-

рацеллюлярных α -субъединиц и двух трансмембранных β -субъединиц, обладающих внутренней тирозинкиназной активностью [4; 57]. Связывание ИФР-Р1 с соответствующими лигандами приводит к его олигомеризации, аутофосфорилированию и активации внутренней тирозинкиназы. Далее тирозинкиназа ИФР-Р1 прямо фосфорилирует различные клеточные субстраты и сигнальные молекулы, участвующие в регуляции апоптоза, построении цитоскелета и процессах клеточной адгезии, а также во множестве других физиологических процессов в клетках. Рецептор ИФР 2 типа (ИФР-Р2) представляет собой катион-независимый маннозо-6-фосфатный рецептор, и его роль в реализации эффектов ИФР пока неясна.

Известно, что ИФР-сигнальный путь – один из возможных механизмов активации каскада митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и сигнального каскада, ключевыми компонентами которого являются фосфатидилинозитол-3 киназа (PI-3K) и серин-треониновая протеинкиназа Akt (протеинкиназа B) [18].

Установлено, что ИФР-1 индуцирует активацию MAP-киназного пути через белок Ras, что в конечном итоге приводит к ингибированию апоптоза и повышению выживаемости клеток посредством деактивации одного из проапоптотических белков – Bad, а также к усилению пролиферации клеток. Комплекс ИФР-1/ИФР-Р1 индуцирует фосфорилирование и активацию PI-3K, которая, в свою очередь, активирует Akt, фосфорилирующую и инактивирующую Bad и блокирующую апоптоз [32]. Так, например, в исследованиях на культурах клеток РМЖ показано, что активация ИФР-Р1 защищает клетку от апоптоза [39; 54]. Применение ИФР-1 вместе с доксорубицином или паклитакселом приводило к снижению апоптоза в культуре клеток РМЖ – MCF-7 [11]. Более детальное исследование этого эффекта показало, что он развивается, по крайней мере, двумя путями:

1. В результате ингибирования апоптоза вследствие активации PI-3K/Akt
2. В результате индукции пролиферации как по PI-3K/Akt, так и по MAP-киназному пути. В клинике высокие уровни ИФР-Р1 существенно снижают апоптоз, индуцированный лучевой терапией [25; 57].

Помимо прямых эффектов ИФР-1, имеются также данные о взаимодействии ИФР-1 каскада с онкогенами, опухолевыми супрессорами, с другими гормонами, например, с половыми стероидами при РМЖ [47; 53] и раке предстательной железы [2]. ИФР-1 и ИФР-2 в пико- и наномолярных концентрациях, соответственно, стимулируют пролиферацию клеток РМЖ, содержащих рецепторы эстрогенов (РЭ). Они также влияют на чувствительность клеток РМЖ к эстрогенам. Известно, что РЭ работают как лиганд-активированный фактор транскрипции. Наиболее распространенный и активный тип РЭ – РЭ- α – содержит гормон-связывающий домен, ДНК-связывающий домен и два домена активации транскрипции [56]. Связавшись с РЭ- α , эстрадиол вызывает димеризацию и последующее взаимодействие гормон-рецепторного комплекса со специфическими палиндромными последовательностями ДНК, что запускает в свою очередь транскрипцию генов, продукты которых оказывают пролиферативный эффект. Показано, что ИФР-1 увеличивает транскрипционную активность, опосредованную РЭ, и таким образом увеличивает экспрессию эстроген-индуцируемых генов, например, генов рецепторов прогестерона. А ИФРСБ-1, ингибитор действия ИФР-1, не только ингибирует ИФР-опосредованную активацию РЭ, но и оказывает значительный подавляющий эффект на активацию РЭ, опосредуемую эстрогенами.

ИФР перекрестно взаимодействует с системой интегрина (рецепторами клеточной адгезии, вовлеченными в процессы миграции, выживания и роста клеток), поскольку имеет структурное сходство с $\alpha_v\beta_3$ интегрином [31]. Активация системы интегрин приводит к ингибированию митогенных эффектов ИФР-1 в культурах клеток РМЖ человека [5; 15; 24; 44]. И несмотря на то, что механизмы реализации этих перекрестных эффектов неясны, это взаимовлияние вносит, по-видимому, значительный вклад в модулирование биологических эффектов как эстрогенов, так и ИФР, что особенно важно для понимания процессов опухолевого роста и метастазирования.

Для установления роли ИФР-сигнальной системы в злокачественной трансформации эпителиальных клеток молочной железы исследователи изменяли уровни ИФР-1 у животных путем трансген-

ных модуляций синтеза СТГ и ИФР-1 [55]. У трансгенных мышей с повышенным уровнем экспрессии СТГ и ИФР-1 чаще развивались опухоли молочной железы. Однако опухолевые процессы у этих животных не были прямым результатом локального или эндокринного воздействия повышенного уровня ИФР-1, и для выяснения механизма установления полного злокачественного фенотипа требуется определить другие значимые факторы. Таким образом, эффекты ИФР-1, по-видимому, являются вторичными в процессах опухолеобразования.

В исследованиях на трансгенных мышцах с гиперэкспрессией человеческого ИФР-1 в молочной железе было показано, что у 53% животных развивалась аденокарцинома молочной железы [55]. Риск развития РМЖ повышался еще больше при скрещивании этих трансгенных мышей с мышцами, мутантными по гену p53. У ИФР-1-дефицитных мышей, со сниженным на 75% уровнем ИФР-1 в плазме крови, напротив, образование опухоли наблюдали существенно реже. В результате этих исследований был сделан вывод о том, что повышение уровня ИФР-1 в периферической крови или локально в ткани молочной железы в значительной степени способствует развитию рака молочной железы. Исследования на приматах также подтвердили предположение о роли ИФР-1 в этиологии заболевания, показав, что введение животным СТГ или ИФР-1 приводит к гиперплазии молочной железы [24].

В итоге, сегодня мы располагаем примерами, иллюстрирующими вклад ИФР-1 на всех стадиях развития опухолевого процесса: злокачественной трансформации клеток, роста опухоли, местной инвазии и отдаленного метастазирования, устойчивости к лечению.

В отличие от инсулина, циркулирующие ИФР связываются высокоаффинными связывающими белками (ИФРСБ) [23]. В настоящее время известно шесть ИФРСБ, а также семейство гомологичных связывающих белков, которые обладают значительно меньшим сродством к ИФР-лигандам. ИФРСБ модулируют биологическую доступность и активность ИФР несколькими способами: они осуществляют перенос ИФР из периферической крови к тканям-мишеням (ИФРСБ-1, 2 и 4), поддерживают резервный уровень ИФР в крови (это преимущественно функция ИФРСБ-3), потенцируют или ингибируют эффекты ИФР, а также опосредуют ИФР-независимые биологические эффекты [44]. Расщепление ИФРСБ специфическими протеазами модулирует уровни свободных ИФР и ИФРСБ, а таким образом и эффекты ИФР в тканях.

Клинические исследования системы ИФР

Активные исследования системы ИФР в последние 10 лет установили прямую зависимость между высоким уровнем ИФР-1 в крови и риском развития злокачественных опухолей. У человека ИФР-1 играет определенную роль в развитии рака предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, яичников, легкого, шейки матки [9; 10; 14; 15; 16; 19; 24; 26; 32; 36; 37; 44; 46; 51; 52; 53].

В молочной железе ИФР-1 обнаруживается главным образом в нормальных стромальных клетках, ИФР-2 также определяется преимущественно в клетках стромы, однако может быть обнаружен и в злокачественном эпителии молочной железы. Высокий уровень экспрессии ИФР-2 ассоциируется с плохим прогнозом при РМЖ. У пациенток с доброкачественными новообразованиями молочной железы экспрессия ИФРСБ-3 также существенно вы-

ше в опухолях по сравнению с окружающей нормальной тканью. Однако не было выявлено какой-либо значимой взаимосвязи между экспрессией ИФРСБ-3 в опухолевых тканях и общей или безрецидивной выживаемостью при РМЖ [41].

Что касается рака молочной железы, то данные исследований роли системы ИФР и связывающих белков носят противоречивый характер. Так, The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group было проведен анализ данных 17 проспективных исследований в 12 странах, однако, взаимосвязи сывороточного ИФР-1, ИФРСБ3 с такими известными факторами риска РМЖ, как менопаузальный статус и РЭ-статус остались неясными [13]. Результаты других исследований, напротив, предполагают, что взаимосвязь между уровнями циркулирующего ИФР-1 и риском РМЖ зависит от менопаузального статуса. По данным ряда авторов [3; 27; 38; 40; 42; 43; 45], уровни циркулирующих ИФР-1, ИФРСБ-1, ИФРСБ-3 и СТГ, по-видимому, не имеют однозначной ассоциации с риском РМЖ у женщин в менопаузе (моложе 45 лет), и более важны для женщин в постменопаузе. Имеются также данные, предполагающие защитную роль ИФРСБ-3 и одновременно демонстрирующие повышение риска РМЖ при высоком уровне СТГ-связывающего белка, с учетом вариаций уровней ИФР-лигандов, ИФРСБ и классических факторов риска РМЖ [35]. Это наблюдение согласуется с результатами, полученными в другом исследовании [26]: при высоком сывороточном ИФР-1 канцерогенез в молочной железе наблюдался у женщин в менопаузе (моложе 50 лет) в 2,33 раза чаще, чем при низком уровне этого фактора роста, но риск развития опухоли при высоком уровне ИФР-1 значительно повышался с возрастом: относительный риск составил 4,58 у женщин в постменопаузе.

Не только ИФР-1, но также и другие компоненты системы реализации эффектов ИФР вовлечены в процессы опухолеобразования. Так, известно, что содержание тканевых рецепторов ИФР-1 повышено во всех линиях клеток рака молочной железы и очень часто повышение уровня ИФР-Р1 наблюдается в свежих биоптатах РМЖ по сравнению с нормальным эпителием. А тот факт, что уровень ИФР-Р1 мРНК, напротив, оказывается выше в нормальном эпителии молочной железы, чем в ткани опухоли, возможно, как предполагают Y.H. Ibragim et al. [24], свидетельствует о том, что в процессах канцерогенеза в молочной железе важны посттрансляционные механизмы экспрессии мРНК ИФР-Р1. Эстрогены индуцируют экспрессию ИФР, рецепторов ИФР, ИФРСБ. Известно также, что уровень ИФР-Р1 положительно коррелирует с экспрессией РЭ-α, и, сходным с РЭ-α образом, высокий уровень ИФР-Р1 коррелирует с положительным прогнозом РМЖ. Тамоксифен снижает фосфорилирование ИФР-Р1 в культуре клеток МСF-7, характеризующейся гиперэкспрессией ИФР-Р1. Собственно высокий уровень ИФР-Р1 в опухоли еще не означает, что этот путь воздействия ИФР-1 активирован, но показано, что в ткани РМЖ 40-кратно повышены аутофосфорилирование ИФР-Р1 и его тирозинкиназная активность по сравнению с нормальным эпителием молочной железы. Однако этот вопрос остается открытым. Возможно, интактный ИФР-Р1 в ткани ИМЖ характеризует РЭ-α-экспрессирующие опухоли как более агрессивные. Возможно также, что в качестве комбинированной терапии РМЖ может оказаться эффективным совместное ингибирование механизмов, опосредованных ИФР-Р1 и РЭ.

Как уже упоминалось, повышенный уровень ИФР-1 в крови является независимым фактором риска РМЖ у женщин в менопаузе [26]. Антиэстрогены, такие, как тамоксифен, влияют на функцию РЭ-α путем блокирования инициации транскрипции, не подавляя связывание гормон-рецепторного комплекса с ДНК. Ралоксифен, аналог тамоксифена, применяемый для профилактики остеопороза у женщин в менопаузе, значительно снижал уровень сывороточного ИФР-1 у женщин в постменопаузе, больных РМЖ [12]. По другим данным, низкие дозы тамоксифена (10-20 мг/день) незначительно снижали уровень ИФР-1, увеличивали содержание ИФРСБ-1 и незначительно изменяли содержание ИФРСБ-3. Небольшое изменение соотношения ИФР-1/ИФРСБ-3 может оказаться еще одним фактором, снижающим эффективность тамоксифена в низких дозах с целью предупреждения РМЖ [2]. Тамоксифен приводит к снижению концентрации ИФР-1 и увеличивает концентрацию ИФРСБ, преимущественно ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 [5]. Антиэстрогены, таким образом, могут ингибировать действие ИФР посредством увеличения экспрессии ИФРСБ-3, воздействуя на процесс фосфорилирования ИФР-Р1 и снижая экспрессию РЭ, что установлено в исследованиях у женщин в менопаузе с высоким риском развития инвазивного РМЖ, и у женщин в постменопаузе [5; 8; 16]. Таким образом, практически все компоненты системы реализации эффектов ИФР могут рассматриваться как промоторы роста, регулируемые эстрогенами.

Ингибирование путей реализации эффектов ИФР возможно окажется полезным и в качестве превентивной меры против РМЖ. Поскольку повышенный уровень ИФР-1 в крови свидетельствует о повышении риска развития рака, то манипулирование уровнем ИФР-1 может привести к снижению риска рака, что может иметь важное клиническое значение.

Возможности

ингибирования системы ИФР

Существующий принцип прицельной («таргетной») терапии заключается в блокировании активности биологически важных молекул, в частности, рецепторов, опосредующих возникновение и прогрессирование заболевания. Этот подход показал свою клиническую эффективность в случае РЭ, HER2 (ErbB2), и совсем недавно – РЭФР (ErbB1) экспрессирующих злокачественных новообразований. В случае с ИФР в связи с участием нескольких компонентов системы в реализации его эффектов, имеет смысл рассмотреть и множественное воздействие, в частности, редукцию и нейтрализацию ИФР-лиганда, подавляющую регуляцию и конкурентное связывание с ИФР-рецептором [20], а также развитие ИФР-независимых антагонистических стратегий [1; 7; 22; 24; 28; 48; 49].

Поскольку действие ИФР-1 и эстрогенов взаимосвязано, можно предположить, что ингибирование одновременно обеих систем может быть более эффективным для лечения РМЖ, чем блокирование каждой системы в отдельности. Предпринимались попытки использовать при РМЖ аналоги соматостатина – октреотид и пегвисомант, но без существенного успеха.

Несмотря на то, что снижение уровня эндокринного ИФР-1 может быть полезным для предотвращения и лечения РМЖ, эта стратегия не оказывает эффекта на уровень ИФР-2 в крови, а ингибирование ИФР-2 совершенно необходимо, так как ИФР-2 присутствует в крови взрослых людей.

Как полагают Y.H. Ibrahim et al. [24], более перспективным подходом может быть разработка соединений, оказывающих прямое ингибирующее действие на систему ИФР, включая эндогенные ИФРСБ, связывающие оба лиганда, нейтрализующие лиганды ИФР-рецепторов и блокирующие активацию самих рецепторов.

Логичным является подход, основанный на использовании эндогенных ингибиторов действия ИФР-1 в тканях. В качестве таких ингибиторов можно использовать ИФР-связывающие белки. ИФРСБ обеспечивают транспорт ИФР к клеткам-мишеням и модулируют действие ИФР в тканях. ИФРСБ обнаружены в клетках РМЖ, однако их уровень сильно зависит от РЭ статуса опухоли и является эстроген-регулируемым, что позволяет сделать предположение о том, что опухолевые клетки сами модулируют свой собственный ИФР-1 сигнал и способствуют формированию злокачественного фенотипа. Таким образом, участие ИФРСБ в реализации эффектов ИФР заставило исследователей обратить на них внимание с целью терапевтического использования этого звена регуляции. Показано, что ИФРСБ-1 ингибирует действие ИФР-1, снижает ИФР-индуцированную миграцию и пролиферацию клеток. Известно также, что ИФРСБ останавливают эстроген-индуцированный рост клеток МСФ-7 и ингибируют ИФР-1-стимулированную миграцию клеток *in vitro*. Помимо этих эффектов, ИФРСБ, по-видимому, воздействуют на связывание интегрина и иные внутриклеточные механизмы регуляции злокачественного роста независимо от лигандов. Фармакокинетические свойства ИФРСБ могут оказаться важными для создания анти-ИФР-агентов. Например, полиэтиленгликоль-конъюгированный ИФРСБ-1 ингибирует рост РМЖ *in vivo* [24].

Другие ИФРСБ, по-видимому, также вовлечены в процессы опухолевого роста. Известна, например, регуляторная роль мембранного ИФРСБ-3 в присутствии ИФР-1, а также его ИФР-независимые эффекты на рост монослойной культуры Hs578T клеток РМЖ *in vitro*. Известно, что экзогенный ИФРСБ-3 усиливает противоопухолевые свойства паклитаксела. Однако, на сегодняшний день неясно, имеет ли смысл использовать ИФРСБ для подавления опухолевого роста самостоятельно, или эффективнее окажется применение более сложных воздействий, например, проапоптотического и анти-ИФР. Некоторые экспериментальные и эпидемиологические исследования предполагают возможность использования ингибиторов СОХ-2 для предотвращения РМЖ (целекоксиб). Относительно невысокая токсичность этих веществ немаловажна для их использования, однако не совсем ясен механизм хемотерпевтического эффекта. Установлено, что целекоксиб индуцировал апоптоз в иммортализованной линии клеток молочной железы 184htert. Наблюдалось повышение экспрессии мРНК ИФРСБ-3, который является потенциальным проапоптотическим белком и ингибитором роста клеток РМЖ, и главным образом ингибирует взаи-

модействие митогенов ИФР-1 и ИФР-2 с их рецепторами на клеточной поверхности, а также действует по ИФР-независимым путям [30].

Другие подходы к целенаправленному воздействию на ИФР-регуляцию злокачественного роста в основном связаны с использованием специфических антител, нейтрализующих лиганд-рецепторное взаимодействие. МКА к ИФР-Р1 эффективно ингибируют действие ИФР-1 в различных опухолях посредством усиления интернализации ИФР-Р1 и эффективного снижения количества ИФР-Р1 на клеточной поверхности [24].

Так как ИФР-Р1 представляет собой тирозинкиназу, логично предположить, что ингибиторы тирозинкиназ могут оказаться эффективными и для нейтрализации действия ИФР-1 в ткани. Тирфостины и подобные им вещества эффективно блокируют биохимическую активацию ИФР-Р1 и останавливают рост клеток РМЖ [6; 22; 24; 34]. Однако, несмотря на то, что стратегии ингибирования этой митогенной системы и основаны на специфическом воздействии на соответствующие рецепторы, они, вероятно, представляют сложность для терапевтического использования.

Причина в том, что молекула ИФР-Р1 на 84% гомологична по аминокислотному составу внутриклеточной β -цепи тирозинкиназы и на 46-67% идентична последовательности экстрацеллюлярной α -цепи инсулинового рецептора. Даже, если будет создан ИФР-Р1-специфический метод, вряд ли им можно будет полностью подавить ИФР-стимулированную активность, так как ИФР осуществляют свои эффекты посредством множества рецепторов, а именно – рецепторов инсулина, ИФР-Р2, инсулин/ИФР-1-гибридного рецептора. Таким образом, ингибирование тирфостинами исключительно ИФР-Р1 на данный момент затруднено. Безусловно исследование анти-ИФР-стратегий для достижений противоопухолевого эффекта, изучение комбинированных схем с используемыми в клинике цитостатиками, необходимы для улучшения результатов лечения целого ряда опухолей.

Предпринятые в этой области попытки исследования влияния цитостатиков на систему ИФР требуют дальнейшего изучения, однако показано, что, например, адъювантная химиотерапия антрациклинами у больных первичным РМЖ (больные получали 5-фторурацил, эпирубин и циклофосфамид или эпирубин и циклофосфамид) не оказывала существенного эффекта на содержание ИФР-1 и ИФРСБ-3, а также их соотношение в сыворотке крови [17].

Неоднозначность и противоречивость результатов исследований подчеркивают, на наш взгляд, сложность взаимоотношений между различными механизмами регуляции нормального роста клеток и канцерогенеза. Однако несомненно, что участие ИФР, их рецепторов и ИФРСБ в процессах опухолевой трансформации, роста и метастазирования делают их перспективной мишенью для противоопухолевой терапии.

Литература

1. Alberobello A.T., D'Esposito V., Marasco D. et al. Selective disruption of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) signaling via phosphoinositide-dependent kinase-1 prevents the protective effect of IGF-1 on human cancer cell death // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, №9. – P. 6563–72.
2. Arnold J.T., Le H., McFann K.K., Blackman M.R. Comparative effects of DHEA vs. testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol on proliferation and gene expression in human LNCaP prostate cancer cells // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2005. – Vol. 288, №3. – P. 573–84.
3. Baglietto L., English D.R., Hopper J.L. et al. Circulating insulin-like growth factor-i and binding protein-3

- and the risk of breast cancer // cancer epidemiol. biomarkers prev. – 2007. – vol. 16, №4. – p. 763-768.
4. Belfiore A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer // Curr. Pharm. Des. – 2007. – Vol. 13, №7. – P. 671-686.
 5. Bonanni B., Johansson H., Gandini S. et al. Effect of low dose tamoxifen on the insulin-like growth factor system in healthy women // Breast Cancer Res. Treat. – 2001. – Vol. 69, №1. – P. 21-27.
 6. Camirand A., Zakikhani M., Young F. et al. Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signaling enhances growth-inhibitory and proapoptotic effects of gefitinib (Iressa) in human breast cancer cells // Breast Cancer Res. – 2005. – Vol. 7, №4. – P. 570-579.
 7. Campbell C.I., Petrik J.J., Moorehead R.A. ErbB2 enhances mammary tumorigenesis, oncogene-independent recurrence and metastasis in a model of IGF-IR-mediated mammary tumorigenesis // Molecular Cancer. – 2010. Vol. 9, №1. – P. 235-251.
 8. Campbell M.J., Woodside J.V., Secker-Walker J. et al. IGF status is altered by tamoxifen in patients with breast cancer // Mol. Pathol. – 2001. – Vol. 54, №5. – P. 307-310.
 9. Chen C., Freeman R., Voigt L.F. et al. Prostate Cancer Risk in Relation to Selected Genetic Polymorphisms in Insulin-like Growth Factor-I, Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3, and Insulin-like Growth Factor Receptor // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2006. – Vol. 15. – P. 2461-2466.
 10. Chen C., Lewis S.K., Voigt L.F. et al. Prostate carcinoma incidence in relation to prediagnostic circulating levels of insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein-3, and insulin // Cancer. – 2004. – Vol. 103, №1. – P. 76-84.
 11. Ciftci K., Su J., Trovitch P.B. Growth factors and chemotherapeutic modulation of breast cancer cells // J. Pharm. Pharmacol. – 2003. – Vol. 55, №8. – P. 1135-1141.
 12. da Silva B.B., Moita D.S., Pires C.G. et al. Evaluation of insulin-like growth factor-I in postmenopausal women with breast cancer treated with raloxifene // Int. Semin. Surg. Oncol. – 2007. – Vol. 4. – P. 18.
 13. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW. et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies // Lancet Oncol. – 2010. – Vol. 11, №6. – P. 530-542.
 14. Eng-wong J., Hursting S.D., Venzon D. et al. Effect of raloxifene on insulin-like growth factor-i, insulin-like growth factor binding protein-3, and leptin in premenopausal women at high risk for developing breast cancer // cancer epidemiol. biomarkers prev. – 2003. – vol. 12. – p. 1468-1473.
 15. Frasca F., Pandini G., Sciacca I. et al. The role of insulin receptors and igf-i receptors in cancer and other diseases // arch. physiol. biochem. – 2008. – vol. 114, №1. – P. 23-37.
 16. Freedland S.J., Aronson W.J. Examining the relationship between obesity and prostate cancer // rev. urol. – 2004. – vol. 6, №2. – p. 73-81.
 17. Fürstenberger G., Senn E., Morant R. et al. Serum levels of IGF-1 and IGFBP-3 during adjuvant chemotherapy for primary breast cancer // Breast. – 2006. – Vol. 15, №1. – P. 64-68.
 18. Grimberg A. Mechanisms by which IGF-I may promote cancer // Cancer Biol. Ther. – 2003. – Vol. 2, №6. – P. 630-635.
 19. Gu F., Schumacher F.R., Canzian F. et al. Eighteen insulin-like growth factor pathway genes, circulating levels of IGF-I and its binding protein, and risk of prostate and breast cancer // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2010. – Vol. 19, №11. – P. 2877-2887.
 20. Guerreiro A.S., Boller D., Doepfner K.T., Arcaro A. IGF-IR: potential role in antitumor agents // Drug News Perspect. – 2006. – Vol. 19, №5. – P. 261-272.
 21. Haffner M.C., Petridou B., Peyrat J.Ph. et al. Favorable prognostic value of SOCS2 and IGF-I in breast cancer // BMC Cancer. – 2007. – Vol. 7. – P. 136.
 22. Hartog H., Wesseling J., Boezen H.M. et al. The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: old focus, new future // Eur. J. Cancer. – 2007. – Vol. 43, №13. – P. 1895-1904.
 23. Holly J., Perks C. The role of insulin-like growth factor binding proteins // Neuroendocrinology. – 2006. – Vol. 83, №3-4. – P. 154-160.
 24. Ibrahim Y.H., Yee D. Insulin-like growth factor-I and breast cancer therapy // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11, № 2(Pt 2). – P. 944-950.
 25. Jameel J.K., Rao V.S., Cawkwell L., Drew P.J. Radioresistance in carcinoma of the breast // Breast. – 2004. – Vol. 13, №6. – P. 452-460.
 26. Johansson H., Baglietto L., Guerrieri-Gonzaga A. et al. Factors associated with circulating levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in 740 women at risk for breast cancer // Breast Cancer Res. Treat. – 2004. – Vol. 88, №1. – P. 63-73.
 27. Kahan Z., Gardi J., Nvari T. et al. elevated levels of circulating insulin-like growth factor-i, igf-binding globulin-3 and testosterone predict hormone-dependent breast cancer in postmenopausal women: a case-control study // int. j. oncol. – 2006. – vol. 29, №1. – p. 193-200.
 28. Larsson O., Girmila A., Girmila L. Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer // Br. J. Cancer. – 2007. – Vol. 96 (Supl.). – P. 2-6.
 29. Laviola L., Natalicchio A., Giorgino F. The IGF-I signaling pathway // Curr. Pharm. Des. – 2007. – Vol. 13, №7. – P. 663-669.
 30. Levitt R.J., Buckley J., Blouin M.J. et al. growth inhibition of breast epithelial cells by celecoxib is associated with upregulation of insulin-like growth factor binding protein-3 expression // biochem. biophys. res. commun. – 2004. – vol. 316, №2. – P. 421-428.
 31. Ling Y., Maile L.A., Clemmons D.R. Tyrosine phosphorylation of the $\beta 3$ -subunit of the $\alpha V\beta 3$ integrin is required for membrane association of the tyrosine phosphatase SHP-2 and its further recruitment to the insulin-like growth factor I receptor // Mol. Endocrinol. – 2003. – Vol. 17. – P. 1824-1833.
 32. Moschos S.J., Mantzoros C.S. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications // Oncology. – 2002. – Vol. 64. – P. 317-332.

33. *Pavelić J., Matijević T., Knezević J.* Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family // *Indian J. Med. Res.* – 2007. – vol. 125, №4. – p. 511-522.
34. *Paz K., Hadari Y.R.* Targeted therapy of the insulin-like growth factor-1 receptor in cancer // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* – 2008. – Vol. 11, №1. – P. 62-69.
35. *Pazaitou-Panayiotou K., Kelesidis T., Kelesidis I. et al.* Growth hormone-binding protein is directly and IGFBP-3 is inversely associated with risk of female breast cancer // *Eur. J. Endocrinol.* – 2007. – Vol. 156, №2. – P. 187-94.
36. *Platz E.A., Pollak M.N., Leitzmann M.F. et al.* Plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and subsequent risk of prostate cancer in the psa era // *Cancer Causes Control.* – 2005. – vol. 16, №3. – p. 255-262.
37. *Pollak M.N., Schernhammer E.S., Hankinson S.E.* Insulin-like growth factors and neoplasia // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 505-518.
38. *Probst-Hensch N.M., Steiner J.H., Schraml P. et al.* IGFBP2 and IGFBP3 protein expressions in human breast cancer: association with hormonal factors and obesity // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol.16, №3. – P. 1025-1032.
39. *Prueitt R.L., Boersma B.J., Howe T.M. et al.* Inflammation and IGF-I activate the Akt pathway in breast cancer // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 120, №4. – P. 796-805.
40. *Rajski M., Zanetti-Dällenbach R., Vogel B. et al.* IGF-I induced genes in stromal fibroblasts predict the clinical outcome of breast and lung cancer patients // *BMC Med.* – 2010. – Vol. 5, №8. – P. 18-36.
41. *Ren Z., Shin A., Cai Q. et al.* IGFBP3 mRNA expression in benign and malignant breast tumors // *Breast Cancer Res.* – 2007. – Vol. 9, №1. – P. 2-11.
42. *Rehman A.G., Zwahlen M., Minder C. et al.* Insulin-like growth factor (igf)-i, igf binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis // *Lancet.* – 2004. – vol. 363, № 9418. – p. 1346-1353.
43. *Rollison D.E., Newshaffer C.J., Tao Y. et al.* Premenopausal levels of circulating insulin-like growth factor I and the risk of postmenopausal breast cancer // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 118, №5. – P. 1279-1284.
44. *Samani A.A., Yakar S., LeRoith D. et al.* The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights // *Endocr. Rev.* – 2007. – Vol. 28, №1. – P. 20-47.
45. *Schernhammer E.S., Holly J.M., Hunter D.J. et al.* Insulin-like growth factor-I, its binding proteins (IGFBP-1 and IGFBP-3), and growth hormone and breast cancer risk in The Nurses Health Study II // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2006. – Vol. 13, №2. – P. 583-592.
46. *Singer C.F., Mogg M., Koestler W. et al.* insulin-like growth factor (igf)-i and igf-ii serum concentrations in patients with benign and malignant breast lesions // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – vol. 10. – p. 4003-4009.
47. *Sisci D., Surmacz E.* Crosstalk between IGF signaling and steroid hormone receptors in breast cancer // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – Vol. 13, №7. – P. 705-717.
48. *Smith J., Axelrod D., Singh B., Kleinberg D.* Prevention of breast cancer: the case for studying inhibition of IGF-1 actions // *Ann. Oncol.* – 2011(Suppl. 1). – P. 50-52.
49. *Ulanet D.B., Ludwig D.L., Kahn C.R., Hanahan D.* Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R targeted therapy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107, №24. – P. 10791-10798.
50. *Varela-Nieto I., Hartl M., Gorospe I., Leon Y.* Anti-apoptotic actions of insulin-like growth factors: lessons from development and implications in neoplastic cell transformation // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – Vol. 13, №7. – P. 687-703.
51. *Vestey S.B., Perks C.M., Sen Ch. et al.* Immunohistochemical expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in invasive breast cancers and ductal carcinoma in situ: implications for clinicopathology and patient outcome // *Breast Cancer Res.* – 2005. – vol. 7, №1. – p. 119-129.
52. *Weiss J.M., Huang W.Y., Rinaldi S. et al.* IGF-1 and IGFBP-3: Risk of prostate cancer among men in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 121, №10. – P. 2267-2273.
53. *Werner H., Bruchim I.* Basic and clinical significance of IGF-I-induced signatures in cancer // *BMC Med.* – 2010. – Vol. 8, №1. – P. 2-18.
54. *Werner H., Maor S.* The insulin-like growth factor-i receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2006. – vol. 17, №6. – p. 236-242.
55. *Yakar S., Leroith D., Brodt P.* The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2005. – Vol. 16. – P. 407-420.
56. *Zhang S., Li X., Burghardt R. et al.* Role of estrogen receptor (ER) alpha in insulin-like growth factor (IGF)-I-induced responses in MCF-7 breast cancer cells // *J. Mol. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 35, №3. – P. 433-447.
57. *Zhang X., Yee D.* Tyrosine kinase signalling in breast cancer: Insulin-like growth factors and their receptors in breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2000. – Vol. 2, №3. – P. 170-175.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 612.014.464

*Н.Г. Кормош***ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ И ОРГАНИЗМА В ЦЕЛОМ – ВЗГЛЯД КЛИНИЦИСТА. Ч. 2.***ФГБУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация:***Наталья Геннадьевна Кормош, врач-хирург отделения опухолей женской репродуктивной системы НИИ КО***Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)-324-98-35**E-mail:** nkormosh@hotmail.com

Статья поступила: 29.04.2011, принята к печати 18.01.2012.

Резюме

Представлен анализ литературы по вопросам физиологической роли активных форм кислорода (АФК) на клеточном уровне и в организме в целом. Показано, что изменение уровня АФК приводит к широкому спектру клеточных ответов, таких как пролиферация, дифференцировка, миграция и гибель клеток. Образование АФК в ряде случаев имеет значение для регуляции функций организма в целом: уровня неспецифической и специфической иммунной защиты, сосудистого тонуса, ангиогенеза, поддержания парциального давления кислорода в органах и средах, синтеза гормонов щитовидной железы. Многие из этих процессов носят адаптационный характер.

Ключевые слова: активные формы кислорода, физиология, редокс-гомеостаз.*Kormosh N.G.***PHYSIOLOGICAL ROLE OF REACTIVE OXYGEN AT THE CELLULAR LEVEL AND THE ENTIRE ORGANISM – LOOK CLINICIANS. PART 2.***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow***Abstract**

Redox-homeostasis is critical in regulating many cellular processes pertinent to cell survival. Change the level of ROS leads to a wide range of cellular responses such as proliferation, differentiation, migration and cell death. ROS also are signaling molecules for many physiological functions: nonspecific and specific immune protection, regulation of vascular tone, angiogenesis, monitoring of oxygen tension, and the synthesis of thyroid hormones. Many of the ROS-mediated responses are adaptive in nature.

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

Ранее [2] нами рассмотрены данные о физиологической роли активных форм кислорода на субклеточном уровне. В ней было показано, что АФК постоянно образуются и являются необходимым компонентом жизнедеятельности клеток и организма в целом, а АФК и антиоксидантная система образуют редокс-гомеостатическую систему, обеспечивающую возможность функционального ответа на сигнал. Также продемонстрировано, что для поддержания физиологического уровня АФК требуется постоянная регенерация различных компонентов АОС, а это активные энергоёмкие процессы, требующие согласованной работы на всех физиологических уровнях – геномном, субклеточном, клеточном и органном.

Данные литературы, обсуждаемые в первой статье, свидетельствуют о том, что интенсификация окисления с участием АФК, расцениваемая как окислительный стресс, может быть проявлением различных процессов происходящих в клетках: интенсификации метаболизма, мобилизации защитных сил и деструкции. Какие изменения вызывают АФК на клеточном уровне и как они влияют на организм в целом – рассмотрено в настоящем обзоре.

Роль АФК на клеточном уровне

Изучение окислительного стресса на клеточном уровне показало, что воздействие одного и того же окислителя (например, H_2O_2) на пролиферирующие клетки млекопитающих приводит к широкому спектру клеточных ответов, таких как пролиферация, дифференцировка, миграция и гибель клеток. Комплексный анализ этих данных позволяет предположить, что АФК могут функционировать как "классические" вторичные мессенджеры: конкретный ответ зависит от типа клеток, места внутриклеточной генерации и вида АФК, дозы и длительности воздействия [14]. В целом низкий уровень способствует пролиферации или дифференциации; большее количество АФК приводит к остановке деления клетки, а при дальнейшем увеличении концентрации АФК наблюдается её гибель.

Реакция на окислительный стресс в постмитотических клетках зависит от компенсаторных возможностей, а при недостаточности последних может привести только к гибели клетки.

Роль АФК в дифференцировке в основном изучена на эмбриональных клетках *in vitro*. Показано, что дифференцировка в различные клеточные линии может быть связана с увеличением уровня АФК. Причем в одних исследованиях это было обу-

словлено активацией НАДФ•Н-оксидазы [39], в других рост митохондриальных АФК совпадал с глобальным повышением антиоксидантных ферментов [13]. Длительность воздействия АФК также, как и их уровень, влияет на процессы дифференцировки эмбриональных клеток: продолжительное воздействие АФК приводит к угнетению кардиомио- и васкулогенеза, в то время как импульсное воздействие невысокими дозами АФК усиливает дифференциацию в кардиомиоциты, а также образование сосудов [52].

Значимость АФК показана при изучении регуляции Wnt/ β -катенина – сигнального пути, который имеет важное значение для эмбрионального развития, регенерации тканей взрослого организма, а также при злокачественном росте. Установлена роль нуклеоредоксина в модуляции Wnt-сигналикации [22]; показано, что семейство белков Wnt по структуре цистеиннасыщенные гликозилированные, а значит, чувствительны к редокс-регуляции [43].

Ученые The Scripps Research Institute (США) исследовали уровень АФК в процессе развития мозга крыс. Они обнаружили высокий уровень АФК в нейрональных клетках в течение эмбриогенеза и постнатального периода, который не был связан с апоптозом нейронов. Клетки с более низким уровнем АФК дифференцировались в олигодендроциты и астроциты. Нейроны с высоким уровнем АФК затем дифференцировались в большие пирамидальные и мелкие нейроны. Добавление антиоксидантов в культуру не изменяло количества нейронов, но вызывало сдвиги в дифференцировке – увеличивало долю мелких нейронов [59]. Эти данные свидетельствуют, что модуляция уровня АФК влияет на ряд аспектов дифференцировки нейронов.

Одним из механизмов индукции пролиферации клеток является участие АФК в активации митогенных сигнальных путей. Было показано, что различные факторы роста с митогенной активностью, такие как PDGF, FGF2 и EGF активируют MAP-киназные митогенные пути, в которых АФК, генерируемые НАДФ•Н-оксидазой, являются необходимым компонентом [34]. Ингибирование этого фермента приводит к снижению уровня АФК и, в зависимости от дозы, блокированию EGF и PDGF-индуцированной пролиферации клеток лейомиомы [45]. Пролiferация гладкомышечных клеток сосудов, вызванная стимуляцией EGF, подавляется гиперэкспрессией каталазы и СОД, что подтверждает роль АФК в этом процессе [55].

Окислительные изменения, обусловленные ростом АФК, могут приводить к остановке деления клетки, так называемому аресту клеточного цикла. Этот процесс происходит из-за умеренного повреждения клеток и включает системы репарации. Davies K.J., изучая клеточный цикл, показал, что после остановки деления клетки, вызванной ростом АФК, наблюдается преимущественная экспрессия генов окислительной защиты и репарации ДНК [16]. При недостаточности систем репарации и окислительной защиты арест клеточного цикла может стать необратимым или запускаются механизмы клеточной гибели.

Необратимый арест клеточного цикла как следствие редокс-опосредованной дисрегуляции известен как «репликативное старение». В культурах *in vitro* фибробласты и эпителиальные клетки человека после 50–60 делений (так называемое "число Хейфлика") необратимо останавливаются в G₁- или G₂-фазе клеточного цикла. Исследования *in vitro* показали, что пролиферативный потенциал

фибробластов и различных Т-клеточных линий людей старшего возраста ниже, чем аналогичных клеток молодых людей [25; 44]. Установлено, что лимит деления клеток обусловлен уменьшением теломер при предыдущих делениях. Показано, что теломеры очень чувствительны к повреждениям, вызванным АФК, а сокращение длины теломер происходит более быстрыми темпами во время окислительного стресса [28]. С другой стороны, редокс-состояние микроокружения также влияет на пролиферацию клеток. Так, обработка фибробластов человека H₂O₂ в сублетальных дозах *in vitro* приводила к остановке клеточного деления [11], а в условиях гипоксии пролиферативный потенциал фибробластов повышался [48]. Однако изменение редокс-состояния как самой клетки, так и окружающей среды приводило к остановке деления не всех клеток – в части их наблюдался апоптоз. Комплексный анализ клеточного ответа на окислительный стресс показал, что имеются отличия в экспрессии генов, в частности p53, уровень которого в апоптотических клетках был значительно выше [12]. В ответ на низкий уровень окислительного стресса p53 проявлял антиоксидантную активность, что и обеспечивало выживаемость клеток; в ответ на высокий уровень окислительного стресса p53 действовал прооксидантно, что вело к дальнейшему повышению стрессорного уровня и приводило к гибели клеток [40].

Высокий уровень АФК при недостаточности компенсаторных механизмов может приводить к различным типам клеточной смерти: апоптозу, аутофагии и некрозу. Механизм гибели клетки определяется уровнем и скоростью роста АФК. При этом первичный источник образования АФК в клетке не имеет значения, поскольку существуют перекрестные связи между образованием АФК различными источниками. Показано, что быстрый рост митохондриальных АФК приводит к активации изоформ НАДФ•Н-оксидазы, которые обеспечивают медленный, но длительный рост АФК, а также снижение активности Na⁺-, K⁺-АТФазного насоса, что, в свою очередь, ведет к деполаризации митохондриальной мембраны, разобщению окислительного фосфорилирования и росту митохондриальных АФК [15].

Два основных пути могут инициировать апоптоз клетки: внутренний – митохондриальный и внешний – рецептор-опосредованный. При митохондриально-зависимой клеточной смерти АФК индуцируют выход цитохрома С из митохондрий и активацию каспазного каскада, p53, и киназ, в том числе C-Jun N-терминальную киназу и p38 MAPK [61].

Активация рецептора TNF- α также может приводить к образованию АФК различными источниками, но в основном митохондриями [26]. В отдельных случаях НАДФ•Н-оксидаза и 5-липоксигеназа тоже могут вносить свой вклад в гибель клетки [32]. В любом случае апоптоз – генетически детерминированный клеточный процесс, при котором гибель клетки сопровождается активацией генома, синтезом многих ферментов и требует энергии.

В последние годы достигнут существенный прогресс в понимании процесса аутофагии. Scherz-Shouval R. показал, что независимо от типа аутофагии и факторов её вызывающих АФК неизменно участвуют в этом процессе; при этом источником АФК являются митохондрии, а в физиологических условиях процесс митофагии средство для элиминации АФК играет защитную роль [53]. Yu L. et al.,

изучая процесс гибели клеток, пришли к выводу, что причина патологического накопления АФК – селективная аутофагическая деградация каталазы [65].

Значительное повышение уровня АФК приводит к деструкции внутриклеточных мембран, выходу АФК из компартментов клетки и разрушению клеточных структур непосредственно самими АФК. Такой процесс называется некрозом. Показано, что при этом также индуцируются и защитный ответ, и апоптотический, но они не успевают реализоваться, поскольку происходит более быстрый процесс – разрушение клеточных структур в результате прямого повреждающего действия АФК [3]. Так, на модели экспериментального сахарного диабета у крыс было показано, что на фоне некроза секретирующих клеток поджелудочной железы инициируются и программы клеточной выживаемости [49].

АФК играют также важную роль в регуляции клеточного цикла. W.C. Burhans и N.H. Heintz, изучая редокс-регуляцию клеточного цикла, обнаружили, что в фазе G₁ АФК стимулируют митогенные пути, которые контролируют активность циклинзависимых киназ и фосфорилирование белка ретинобластомы (pRB), что приводит к вхождению клетки в фазу S клеточного цикла. В ответ на окислительный стресс активизируются факторы транскрипции Nrf2 и Foxo3a, вызывая экспрессию антиоксидантных ферментов и ингибиторов циклинзависимых киназ – P27. В фазе S АФК вызывают «арест» клеточного цикла, принимая участие в дефосфорилировании pRB [9].

Процесс ПОЛ – частный случай окислительных процессов в мембранах клеток. Изучение его позволило установить взаимосвязи между составом клеточных мембран, их структурой и функцией.

Жирные кислоты, определяющие состав липидов, в зависимости от наличия двойных связей между атомами углерода могут быть насыщенными, ненасыщенными и полиненасыщенными. При этом количество и расположение двойных связей определяет их пространственную конфигурацию, а также скорость их окисления. Так, ненасыщенные жирные кислоты образуют цис-изомеры с формированием множественных изгибов по местам двойных связей; поэтому преобладание таких жирных кислот в мембране ведет к изменению её проницаемости. С другой стороны, высокая скорость окисления полиненасыщенных жирных кислот приводит к структурной перестройке мембран, что сопровождается изменением их вязкости [1]. Стационарный, базовый уровень ПОЛ регулирует липидный состав мембран, изменяя долю полиненасыщенных жирных кислот и обеспечивая процесс обновления и перестройки мембран. Это процесс ведет к функциональным изменениям клетки – изменению проницаемости мембран и активности мембраносвязанных ферментов, обеспечивая адаптацию клетки к изменяющимся условиям микроокружения. Кроме того, перекиси липидов участвуют в биосинтезе лейкотриенов, простагландинов, тромбоксанов, стероидных гормонов. Перекиси липидов образуются в любых клетках, однако дальнейшее их преобразование зависит от ферментных систем конкретной клетки. Так, в клетках артериальных сосудов образуется простаглицлин, а в тромбоцитах – тромбоксаны. Образующиеся простагландины оказывают влияние на метаболизм костной ткани, кровообращение и транспорт ионов через мембраны, принимая участие в ремоделировании костной ткани. Синтез высокоактивных веществ с различными биологическими свойствами из одного и того же предшественника – перекиси арахидоновой кислоты – делает процесс ПОЛ универсальным.

Роль АФК на уровне организма

Прежде всего, показано, что действие АФК в многоклеточных организмах зависит от типа и функциональной активности каждой клетки [7]. Благодаря высокой реакционной способности АФК, место, где они производятся, имеет решающее значение для их биологических эффектов [57].

Реакции многоклеточного организма на АФК подразделяют на защитные (защита от окислительного стресса и поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза), метаболические, функциональные (физиологические) и патологические. Такое подразделение удобно с теоретических позиций для изучения различных процессов, происходящих в организме, однако накопленная экспериментальная информация о структурно-функциональной организации многоклеточных организмов свидетельствует, что существует тесная взаимосвязь между всеми этими реакциями. Многоклеточность подразумевает специализацию клеток для выполнения различных функций, а значит и различный уровень метаболической активности; даже однотипные клетки одного органа могут отличаться по уровню метаболизма и редокс-статусу. Например, активированные макрофаги и нейтрофилы в зоне воспаления генерируют огромное количество АФК, чтобы убить патогенные микроорганизмы, в тоже время другие клетки макроорганизма должны быть защищены от этого окислительного взрыва. С другой стороны, миграция лимфоцитов в зону воспаления и индукция антигенспецифического иммунологического ответа возможна только потому, что они могут активировать мощные защитные механизмы против окислительного стресса.

Хорошо известным примером защиты клеток организма от АФК является индукция гемоксигеназы (HO-1) в фибробластах кожи. АФК, физиологические дозы ультрафиолетового облучения, окислительный стресс вызывают экспрессию HO-1 мРНК [31; 60]. Окисление гема, который в свободном состоянии высокотоксичен и является прооксидантом, катализируется HO-1 (HO-1 – антиоксидантный фермент, экспрессия которого коррелирует с содержанием кислорода в тканях. Устойчивая индукция HO-1 мРНК во многих тканях различных видов млекопитающих позволила использовать HO-1 мРНК как надежный маркер клеточного окислительного стресса на уровне мРНК). W.Y. Seo et al., показали, что регулирование синтеза HO-1 в клетках эпидермиса осуществляется АФК-зависимым сигнальным каскадом ERK/p38-Nrf2-ARE [54].

Ядерный фактор транскрипции Nrf2 оказывает защитное действие, индуцируя экспрессию многих белков, инактивирующих АФК и восстанавливающих клеточные структуры. С использованием олигонуклеотидных микрочипов были определены Nrf2-зависимые гены, кодирующие ферменты детоксикации, глутатион-ассоциированные белки, антиоксидантные ферменты и противовоспалительные гены [38]. Nrf2 ингибируется цистеинсодержащим белком Keap1, с которым образует неактивный комплекс. Под влиянием АФК окисленный Keap1 отсоединяется от Nrf-2, который активизируется фосфорилированием. J. Maher et al., высказали предположение, что Nrf-2 защищает клетки от окислительного стресса и поддерживает редокс-баланс только при физиологических уровнях [42].

АФК принимают участие в регуляции уровня неспецифической и специфической иммунной защиты. Доказано, что активированные макрофаги и нейтрофилы могут производить значительное количество АФК при помощи фагоцитарной изо-

формы НАДФ•Н-оксидазы. Резкое увеличение потребления кислорода фагоцитирующей клеткой с образованием АФК, обладающих противомикробным действием, называется «респираторным взрывом». Фагоцитарная НАДФ•Н-оксидаза активируется при участии цитозольных фосфорилированных белков р47 и р67 и белка семейства RAC в мембранном комплексе в расположении цитохрома b558. Активация фагоцитарной НАДФ•Н-оксидазы может быть вызвана различными микробными компонентами, такими как бактериальный липополисахарид и липопроtein, а также цитокинами (ИЛ-1 и ИЛ-8) [6]. Активация НАДФ•Н-оксидазы в основном определяется изоформами RAC: RAC2 – в нейтрофилах и RAC1 – в макрофагах и моноцитах [67].

Наследственная недостаточность НАДФ•Н-оксидазы приводит к хроническому гранулематозу. При этом заболевании фагоциты не способны продуцировать супероксидный кислородный радикал и H_2O_2 , поэтому клетки бактерий остаются жизнеспособными внутри фагоцитов, а их антигены вызывают в месте скопления фагоцитов клеточный иммунный ответ и формирование гранулём [29].

Снижение функциональной активности АОС макрофагов в зоне воспаления лимитирует эффективность воспалительного ответа организма. При исследовании перитонеальных макрофагов крыс с острым перитонитом показано, что резистентность клеток к H_2O_2 , а также апоптоз макрофагов определяли жизнеспособность крыс. Сделан вывод, что наличие в экссудате макрофагов, склонных к апоптозу или к некрозу, может использоваться как диагностический критерий воспалительного процесса в брюшной полости [4].

Помимо неспецифической защиты, нейтрофилы участвуют в модулировании иммунологической, специфической защиты организма. Исследования биологических свойств нейтрофилов показали их роль в формировании микроокружения и межклеточного взаимодействия для локализации инфекции и воспаления; участие в активации и созревании макрофагов и дендритных клеток. Относительно молекулярных механизмов этих процессов высказано предположение, что АФК играют центральную роль в модулировании врожденного и адаптивного иммунного ответа [35].

Влияние АФК на иммунные процессы осуществляется, прежде всего, на начальных этапах Т-клеточного иммунного ответа. Показано, что АФК усиливают функцию молекул МНС класса II антигенпрезентирующих клеток [58] и снижают порог активации Т-клеточного рецептора [24] при наличии достаточно большого количества антигенпрезентирующих клеток, умеренного уровня и длительности воздействия АФК. Это приводит к активации Т-лимфоцитов при относительно невысоких концентрациях антигенов, например, на ранних этапах бактериальной инвазии при наличии физиологического уровня и активности антигенпрезентирующих клеток. Не менее важно, что низкие микромольные концентрации перекиси водорода, а также мягкий окислительный сдвиг внутриклеточного тиолового пула способствуют пролиферации и секреции цитокинов Т-клетками [56].

Активация Т-клеток сопровождается дифференцировкой, пролиферацией и секрецией цитокинов. Эти процессы анаболические и энергоёмкие, требующие интенсивной работы митохондрий для синтеза АТФ. Образующиеся при этом АФК определяют фенотип Т-клеток. Показано, что источником АФК, индуцирующих продукцию интерлейки-

нов (2 и 4), являются митохондрии [30]. Наряду с активацией иммунных клеток, нейтрофилы, генерируя высокий уровень АФК, могут деактивировать NK- и Т-клетки за счет истощения внеклеточного уровня L-аргинина, необходимого для активации Т-клеток [47]. Исследования иммунного статуса здоровых людей показали, что у лиц со средними уровнями внутриклеточного глутатиона число CD4 и CD8 Т-клеток выше, чем у лиц с низким или высоким уровнем глутатиона [20].

Хотя АФК образуются и действуют локально, они принимают участие в выполнении определенных физиологических функций органов и систем всего организма.

АФК вносят свой вклад в поддержание парциального давления кислорода в кровотоке в целом и в отдельных областях организма. Хеморецепторные клетки каротидных тел высокочувствительны к изменению напряжения кислорода в артериальной крови. Они представлены нейроэктодермальными клубочковыми клетками I типа и высвобождают медиаторы в синапсы нейронов, ведущих к дыхательному центру. Показано, что в ответ на гипоксию в хеморецепторах увеличивается активность изоформы НАДФ•Н-оксидазы, которая генерирует АФК, которые, в свою очередь, изменяют проницаемость клеточной мембраны и работу K^+ -каналов [64]. Этот процесс ведет к увеличению Ca^{2+} в клетке, деполяризации мембраны и выходу нейромедиатора в синапс. Изменение уровня электрической активности в эфферентных волокнах языкоглоточного нерва ретранслируется в сенсорную информацию в стволовых нейронах мозга, которые регулируют дыхание [19].

АФК принимают участие в регуляции продукции эритропоэтина. В экспериментальных условиях показано, что образование эритропоэтина подавляется перекисью водорода, а добавление каталазы в условиях нормальной оксигенации стимулирует его продукцию [10]. Регулятором экспрессии гена эритропоэтина является HIF-1 – гетеродимерный белок, состоящий из 2 субъединиц, -1α и -1β . В условиях нормальной оксигенации HIF-1 α быстро расщепляется в протеасомах с участием АФК [27; 63]. Гипоксия уменьшает АФК-опосредованную деградацию HIF-1 α и тем самым увеличивает образование гетеродимерного комплекса HIF-1 [68]. Последний обнаружен в большинстве, если не во всех клетках человека. По мере изучения число генов, активируемых HIF-1, продолжает увеличиваться. На сегодняшний день показана важная роль HIF-1 в ангиогенезе, энергетическом метаболизме, эритропоэзе, контроле легочной вентиляции, клеточной пролиферации, вазомоторных и иммунных реакциях [18]. АФК принимают участие в регуляции сосудистого тонуса, способствуя дифференциации кровоснабжения, а значит, и доступности кислорода в различных тканях. Практически во всех типах клеток сосудистой стенки и кардиомиоцитах обнаружено образование АФК, основными источниками которых являются изоформы НАДФ•Н-оксидазы. Активация этого ферментного комплекса происходит при действии различных факторов – гормонов, факторов роста, цитокинов, а также при гемодинамических и метаболических изменениях [23]. Причем, если действие гормонов и факторов роста опосредовано соответствующими мембранными рецепторами, то гемодинамические и метаболические изменения непосредственно приводят к активации НАДФ•Н-оксидазы и образованию АФК. Такая особенность образования АФК в сосудистой системе позволяет рассматривать их как элемент единой реак-

ции на воздействие и модулятор сигнальных путей [8]. АФК, образованные комплексами НАДФ•Н-оксидазы гладкомышечных клеток сосудов, регулируют активность сигнальных белков p38 MAPK и необходимы для реализации эффекта ангиотензина II [50]. Из изученных изоформ НАДФ•Н-оксидазы в клетках сердечно-сосудистой системы в физиологических условиях обнаружены Nox1, Nox2 и Nox4. Все изоформы комплекса имеют общую каталитическую субъединицу (Nox), которая взаимодействует с различными мембранными белками, включая гуанозинтрифосфатазу, цитозольными белками (phox) и белками цитоскелета [5]. Все эти ферменты отличаются по способу активации, экспрессии или взаимодействия с другими белками, а также по виду АФК, которые генерируются.

R. Ray et al., изучали роль изоформ НАДФ•Н-оксидазы в регуляции артериального давления у трансгенных мышей с гиперэкспрессией эндотелиальных Nox4. У таких мышей обнаружена значительная вазодилатация и снижение артериального давления за счет повышения уровня ацетилхолина или гистамина в клетках эндотелия по сравнению с диким помесом. Авторами также установлено, что эндотелиальная Nox4 генерирует перекись водорода, вызывая вазодилатацию, причем этот эффект не связан с биологической ролью оксида азота [51]. Показана физиологическая роль Nox-4 в кардиомиоцитах как ключевого регулятора ангиогенеза миокарда, определяющего адаптацию сердечной деятельности к нагрузкам. При исследовании механизмов, лежащих в основе этого защитного эффекта, выявлено, что в отличие от других изоформ активность Nox4 регулируется, в основном, уровнем его экспрессии, которая увеличивается в кардиомиоцитах под воздействием увеличения давления или гипоксии, что приводит к активации EGFR и увеличению паракринной ангиогенной активности [66]. Активация Nox1 и Nox2 ассоциируется с гипертензией сосудистого происхождения и связана с увеличением сосудистой сократимости, гипертрофии и пролиферации гладкомышечных и других клеток сосудистой стенки. Предполагается, что одним из механизмов такого эффекта является сопряженность рецептов ангиотензина II, PDGF с комплексами Nox1 и Nox2 на мембране клеток; а также СОД-опосредованная инактивация NO [36]. АФК принимают участие в синтезе гормонов щитовидной железы. Йодирование тиреоглобулина является ключевым шагом в биосинтезе гормонов щитовидной железы. Эта реакция требует перекиси водорода, которая образуется из супероксида, генерированного щитовидной изоформой НАДФ•Н-оксидазы. Изоформы тиреопероксидазы катализируют две реакции: йодирование тирозинового остатков тиреоглобулина и слияние йодотирозин в процессе синтеза тироксина и трийодтиронина. Обе формы этого фермента изучены на молекулярном уровне.

Литература

1. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты // Рос.хим.ж. (Ж.Рос. хим. Об-ва им. Менделеева). – 2007. – т. L1. – №1. – С. 3-12.
2. Кормиш Н.Г. Физиологическая роль активных форм кислорода (субклеточный уровень) – взгляд клинициста // РБЖ. – 2011. – №4. – С. 29-35.
3. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Роль свободнорадикальных процессов. // Российский физиологический журнал. – 2005. – N 6. – С. 636-655.
4. Трофимов В. А., Аксенова О. Н., Власов А. П. Склонность макрофагов к H₂O₂-индуцированному апоптозу. // Фунд. иссл. – 2004. – №4. – С. 122-3.
5. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology // Physiol Rev. – 2007. – №87 (1). – P. 245-313.
6. Bonizzi G., Piette J., Merville M.P., Bours V. Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor B activation by interleukin-1 // Biochem Pharmacol. – 2000. – №59. – P. 7-11.
7. Bowie A., O'Neill L.A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries // Biochem Pharmacol. – 2000. – №59 (1). – P. 13-23.
8. Brandes R.P., Weissmann N., Schröder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease // Free Radic Biol Med. – 2010. – №49 (5). – P. 687-706.
9. Burhans W.C., Heintz N.H. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate // Free Radic Biol Med. – 2009. – №47 (9). – P. 1282-1293.

Установлено, что это гликозилированный мембраносвязанный гемопротеиновый фермент содержащий железо, изменение валентности которого играет важную роль в передаче электрона при образовании реакционно активных форм йода – I[•] и HOI [21]. Генетические исследования позволили определить ген, кодирующий этот фермент [17]. Роль тиреопероксидазы в биосинтезе гормонов щитовидной железы была окончательно доказана *in vivo* – ассоциацией мутаций в этом гене с развитием гипотиреоза [62]. АФК принимают участие в регуляции адгезии клеток. Молекулы клеточной адгезии играют важную роль в эмбриогенезе, пролиферации и дифференциации клеток. Адгезия лейкоцитов на эндотелиальных клетках в посткапиллярных венах, например, является первым шагом в хроническом воспалении. Экспрессия молекул клеточной адгезии стимулируется бактериальными липополисахаридами и различными цитокинами, такими как TNF-α, ИЛ-1, ИЛ-8 [37]. Адгезия лейкоцитов к эндотелиальным клеткам также может индуцироваться АФК. S.R. Kim et al. доказали, что адгезия лейкоцитов к эндотелиальным клеткам сосудов и аорты осуществляется за счет индукции ICAM-1 и VCAM-1 на мембранах эндотелиальных клеток с помощью АФК и активации фактора транскрипции NF-kB. Антиоксиданты блокировали образование АФК, инактивировали NF-kB, снижали уровень мембранных молекул ICAM-1 и VCAM-1 и купировали адгезию лейкоцитов [33]. Подобные данные получили Y.C. Liu et al., но в их исследовании индукция молекул клеточной адгезии наблюдалась при низком уровне Глу [41].

Заключение

АФК образуются ферментативно, преимущественно в процессе метаболической активности, являются вторичными мессенджерами во множественных внутриклеточных и тканевых реакциях, модулируют активность митогенных сигнальных путей. Изменение уровня АФК приводит к широкому спектру клеточных ответов, таких как пролиферация, дифференцировка, миграция и гибель клеток. Образование АФК в ряде случаев имеет значение для регуляции функций организма в целом: уровня неспецифической и специфической иммунной защиты, сосудистого тонуса, ангиогенеза, поддержания парциального давления кислорода, синтеза гормонов щитовидной железы. АФК и АОС образуют редокс-гомеостатическую систему, обеспечивающую возможность функционального ответа на сигнал, а также сохранение баланса в изменяющихся условиях внешней и внутренней среды. Процесс адаптации приводит к индивидуализации различных реакций, что, в свою очередь, значительно усложняет изучение этих процессов. Изучение редокс-гомеостаза имеет значение не только для фундаментальной биологии, но и для практической медицины, поскольку окислительный стресс обнаружен при многих заболеваниях. Даже гипотетическая мысль о возможности управления системой редокс-гомеостаза представляется замечательной.

10. Canbolat O., Fandrey J., Jelkmann W. Effects of modulators of the production and degradation of hydrogen peroxide on erythropoietin synthesis // *Respir Physiol.* – 1998. – №114. – P. 175–183.
11. Chen Q., Ames B.N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1994. – №91. – P. 4130–4134.
12. Chen Q.M., Liu J., Merrett J.B. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts // *Biochem J.* – 2000. – №347 (Pt 2). – P. 543–51.
13. Cho Y.M., Kwon S., Pak Y.K. et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – №348. – P. 1472–1478.
14. Covarrubias L., Hernández-García D., Schnabel D. et al. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? // *Dev Biol.* – 2008. – №320(1). – P. 1–11.
15. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – №1797 (6–7). – P. 897–906.
16. Davies K.J. The broad spectrum of responses to oxidants in... // *IUBMB Life.* – 1999. – №48 (1). – P. 41–47.
17. De Deken X., Wang D., Dumont J. E., Miot F. Characterization of DUOX2 proteins as components of the thyroid H(2)O(2)-generating system // *Exp. Cell Res.* – 2002. – №273. – P. 187–196.
18. Dehne N., Brüne B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment // *Exp Cell Res.* – 2009. – №315 (11). – P. 1791–1797.
19. Dinger B., He L., Chen J. et al. The role of NADPH oxidase in carotid body arterial chemoreceptors // *Respir Physiol Neurobiol.* – 2007. – №157 (1). – P. 45–54.
20. Dröge W., Schulze-Osthoff K., Mihm S. et al. Functions of glutathione and glutathione disulfide... // *FASEB J.* – 1994. – №8 (14). – P. 1131–1138.
21. Edens W. A., Sharling L., Cheng G. et al. Tyrosine cross-linking... // *J. Cell Biol.* – 2001. – №154. – P. 879–891.
22. Funato Y., Terabayashi T., Sakamoto R. et al. Nucleoredoxin sustains Wnt/β-catenin signaling by retaining a pool of inactive dishevelled protein // *Curr Biol.* – 2010. – №20 (21). – P. 1945–52.
23. Griending K.K., Sorescu D., Lassègue B., Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2000. – №20 (10). – P. 2175–2183.
24. Hehner S.P., Breitkreutz R., Shubinsky G. et al. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool // *J Immunol.* – 2000. – №165. – P. 4319–4328.
25. Höhn A., Jung T., Grimm S., Grune T. Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – №48 (8). – P. 1100–1108.
26. Hughes G., Murphy M.P., Ledgerwood E.C. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants // *Biochem J.* – 2005. – №389 (Pt 1). – P. 83–89.
27. Hung L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1... // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1998. – №95. – P. 7987–7992.
28. Joyce M.J., Houben, Harald J.J. et al. Hageman Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress? // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2008. – №44 (3). – P. 235–246.
29. Jurkowska M., Bernatowska E., Bal J. Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. – 2004. – №52 (2). – P. 113–120.
30. Kaminski M.M., Sauer S.W., Klemke C.D. et al. Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression // *J Immunol.* – 2010. – №184 (9). – P. 4827–4841.
31. Keyse S.M., Tyrrell R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1989. – №86. – P. 99–103.
32. Kim J.Y., Yu S.J., Oh H.J. et al. Panaxydol induces apoptosis through an increased intracellular calcium level, activation of JNK and p38 MAPK and NADPH oxidase-dependent generation of reactive oxygen species // *Apoptosis.* – 2010. – PubMed PMID: 21190085.
33. Kim S.R., Bae Y.H., Bae S.K. et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-κB activation in endothelial cells // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – №1783 (5). – P. 886–895.
34. Kreuzer J., Viedt C., Brandes R.P. et al. Platelet-derived growth factor activates production... // *FASEB J.* – 2003. – №17. – P. 38–40.
35. Kumar V., Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system // *Int Immunopharmacol.* – 2010. – №10(11). – P. 1325–1334.
36. Lambeth J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy // *Free Radic Biol Med.* – 2007. – №43 (3). – P. 332–47.
37. Langer H.F., Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation // *J Cell Mol Med.* – 2009. – №13 (7). – P. 1211–1220.
38. Lee J.M., Calkins M.J., Chan K. et al. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis // *J Biol Chem.* – 2003. – №278 (14). – P. 12029–12038.
39. Li J., Stuffs M., Serebner L. et al. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – №17. – P. 3978–88.
40. Liu D., Xu Y. p53, Oxidative Stress, and Aging // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – [Epub ahead of print] – PubMed PMID: 21050134.
41. Liu Y.C., Hsieh C.W., Weng Y.C. et al. Sulforaphane inhibition of monocyte adhesion via the suppression of ICAM-1 and NF-κB is dependent upon glutathione depletion in endothelial cells // *Vascul Pharmacol.* – 2008. – №48 (1). – P. 54–61.
42. Maher J., Yamamoto M. The rise of antioxidant signaling-the evolution... // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2010. – №244 (1). – P. 4–15.
43. Maiese K., Li F., Chong Z.Z., Shang Y.C. The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist? // *Pharmacol Ther.* – 2008. – №118 (1). – P. 58–81.
44. McCarron M., Osborne Y., Story C.J. et al. Effect of age on lymphocyte proliferation // *Mech Ageing Dev.* – 1987. – №41 (3). – P. 211–218.
45. Mesquita F.S., Dyer S.N., Heinrich D.A. et al. Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells // *Biol Reprod.* – 2010. – №82 (2). – P. 341–51.
46. Moskovitz J., Oien D.B. Protein carbonyl and the methionine sulfoxide reductase system // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – №12 (3). – P. 405–415.
47. Oberlies J., Watzl C., Giese T. et al. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase // *Blood.* – 2009. – №182. – P. 5259–5267.
48. Packer L., Fuehr K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells // *Nature.* – 1977. – №267. – P. 423–425.
49. Pavlovic D., Andersen N.A., Mandrup-Poulsen T., Eizirik D.L. Activation of... ERK1/2 contributes... // *Eur Cytokine Netw.* – 2000. – №11(2). – P. 267–274.
50. Petry A., Djordjevic T., Weitnauer M. et al. NOX2 and NOX4... // *Antioxid. Redox Signal.* – 2006. – №8. – P. 1473–1484.
51. Ray R., Murdoch C.E., Wang M. et al. Endothelial Nox4 NADPH Oxidase... // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2011. – PubMed PMID: 21415386.
52. Sauer H., Wartenberg M. Reactive oxygen species... // *Antioxid Redox Signal.* – 2005. – №7 (11–12). – P. 1423–34.
53. Scherz-Shouval R., Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology // *Trends Biochem Sci.* – 2011. – №36 (1). – P. 30–38.
54. Seo W.Y., Goh A.R., Ju S.M. et al. Celastrol induces expression of heme oxygenase-1... // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2011. – PubMed PMID: 21414301.
55. Shi M., Yang H., Motley E.D., Guo Z. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase... // *Am J Hypertens.* – 2004. – №17. – P. 450–456.
56. Tatla S., Woodhead V., Foreman J.C., Chain B.M. The role of reactive oxygen species... // *Free Radic Biol Med.* – 1999. – №26(1–2). – P. 14–24.
57. Terada, L. S. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally // *J. Cell Biol.* – 2006. – №174. – P. 615–623.
58. Tezel G., Yang X., Luo C. et al. Mechanisms of immune system activation in glaucoma: oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2007. – №48 (2). – P. 705–714.
59. Tsatmalis M., Walcott E.C., Makarenkova H., Crossin K.L. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures // *Mol Cell Neurosci.* – 2006. – №33 (4). – P. 345–57.
60. Tyrrell R. Redox regulation and oxidant activation of heme oxygenase-1 // *Free Radical Res.* – 1999. – №31. – P. 335–340.
61. Ueda S., Masutani H., Nakamura H. et al. Redox control of cell death // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – №4 (3). – P. 405–14.
62. Vigone M. C., Fagazzola L., Zamproni L. et al. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings // *Hum. Mutat.* – 2005. – №26 – P. 395.
63. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1... // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1995. – №92. – P. 5510–5514.
64. Weir E.K., Archer S.L. The role of redox changes in oxygen sensing // *Respir Physiol Neurobiol.* – 2010. – №174 (3). – P. 182–191.
65. Yu L., Wan F., Dutta S. et al. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – №103 (13). – P. 4952–4977.
66. Zhang M., Brewer A.C., Schröder K. et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – №107 (42). – P. 18121–18126.
67. Zhao X. et al. Human Monocytes Use Rac1, Not Rac2, in the NADPH Oxidase Complex // *J Biological Chemistry.* – 2003. – №278 (42). – P. 40788–40792.
68. Zhu H., Bunn H.F. Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes // *Respir Physiol.* – 1999. – №115. – P. 239–247.

Список литературы приведен в авторской редакции.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

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

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

%fPSA – fPSA/tPSA
 Akt – протеинкиназа В
 ADMET – drug administration, distribution, metabolism, excretion, and toxicological studies

ASCUS – atypical squamous cells
 of undetermined significance
 AUC – Area Under the Curve
 BDFI – bioactivity-directed fractionation and isolation
 c-Kit – рецептор фактора стволовых клеток
 CFSE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl este
 CIN – cervical intraepithelial neoplasia
 (цервикальные интраэпителиальные неоплазии)
 COX – циклооксигеназа
 CRC – colorectal cancer
 EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
 EPCAM – adhesion molecule of epithelial cells
 EPR effect – enhanced permeability and retention effect
 (эффект повышения проницаемости и удерживания)
 EMT – Epithelio-mezenhimal transition
 FLDF – freeze-dried liposomal drug formulation
 FLICE – cellular Fas-associated death domain-like
 interleukin-1beta-converting enzyme
 GAP – Good Agricultural Practice
 GMP – Good Manufacturing Practice
 GCP – Good Clinical Practice
 GIST – гастроинтестинальные стромальные опухоли
 IBC – inflammatory breast cancer
 IC₅₀ – 50%-ной ингибирующей концентрации ($\cdot$).
 LDCI – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingaron
 LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюис)
 LSIL – low-grade intraepithelial lesions
 MNNG – N-methyl-N¹-nitro-N-nitrosoguanidine
 mTOR – мишень рапамицина в клетках млекопитающих
 Mw – molecular weight (молекулярный вес)
 N-DMNA – N-dimethylnitrosoamine
 NE – nucleic equivalents epitope
 NSE – нейроспецифической энолазы
 NTA – nitril triacetate acid (нитрилтрехуксусная кислота)
 IGFBP – insulin-like growth factor binding protein
 HER – human epidermal growth factor receptor
 HIF-1 α – индуцируемый гипоксией фактор 1 α
 HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1
 HSE – heat shock elements
 HSIL – high-grade intraepithelial lesions
 HSP90 – hot shock protein (белок теплового шока с ММ ~90 кДа)
 MHC – major hystocompatibility complex
 PARP – поли(АДФ-рибоза) полимеразы
 PCa – prostate cancer
 PDGF – тромбоцитарный фактор роста
 PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста
 PDT – photodynamic therapy
 Pr – проспидин
 PSA – prostate-specific antigen
 tPSA – prostate-specific antigen, total form
 fPSA – prostate-specific antigen, free form
 Ph – филадельфийская хромосома
 Ph⁺ – наличие филадельфийской хромосомы
 PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (фосфатидилинозитол 3-киназа)
 RA – rheumatoid arthritis
 RF – rheumatoid factor
 ROC – анализ – Receiver Operating Characteristics curve analysis
 SAL – sterility assurance level
 SCCA – антиген плоскоклеточной карциномы
 TGF – Transforming Growth Factors
 (трансформирующие факторы роста)
 VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor
 VM – vasculogenic mimicry

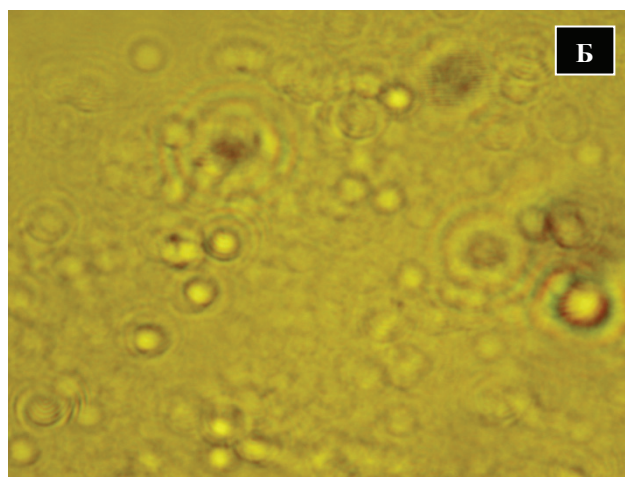
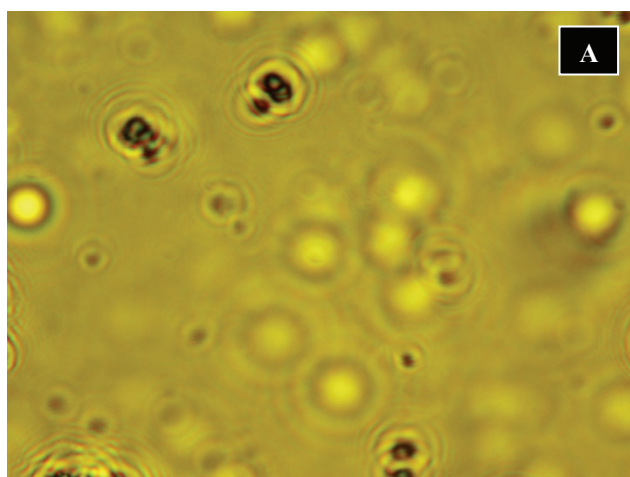


Рис. 1. Размеры и форма протеолипосом лиофильного высушивания и гамма-облучения дозой 12 кГр. $\times 40$.
А: до;
Б: после.

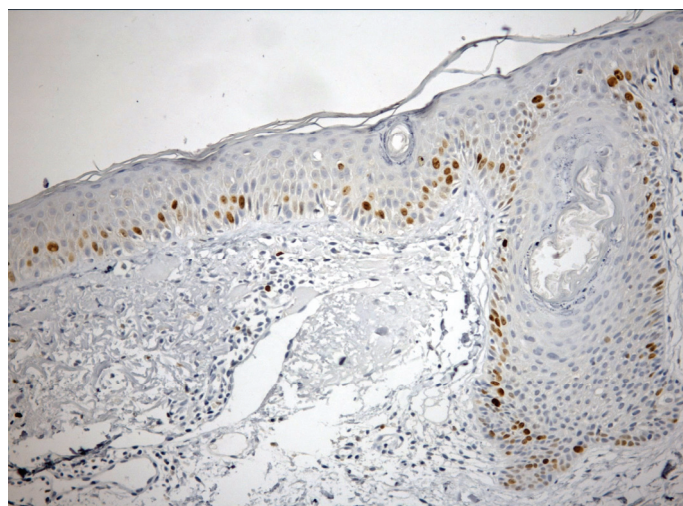


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилином Майера. Экспрессия Ki-67 в базальном слое эпидермиса. $\times 400$.

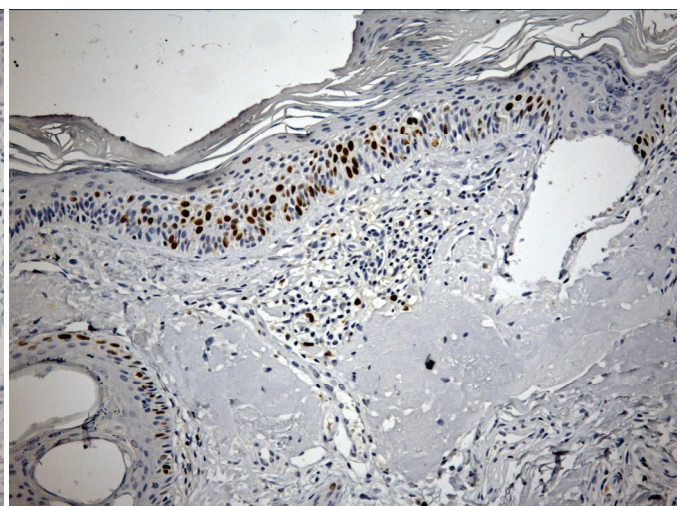


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилином Майера. Распределение Ki-67 в шиповатом слое. $\times 400$.

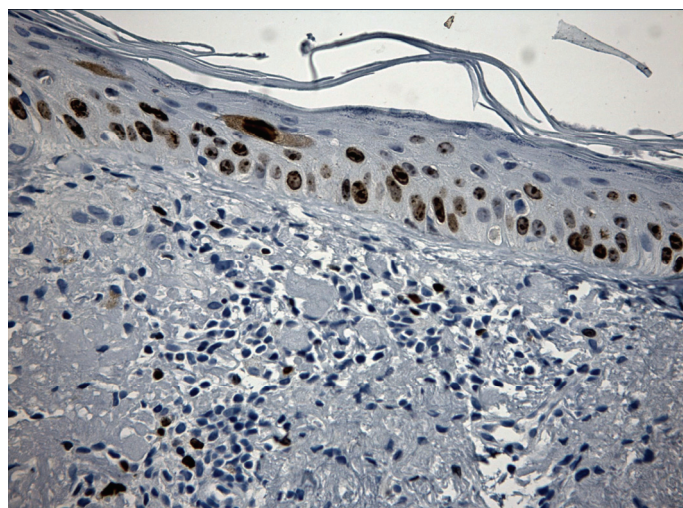


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилином Майера. Распределение эластина на протяжении всей дермы. $\times 200$.

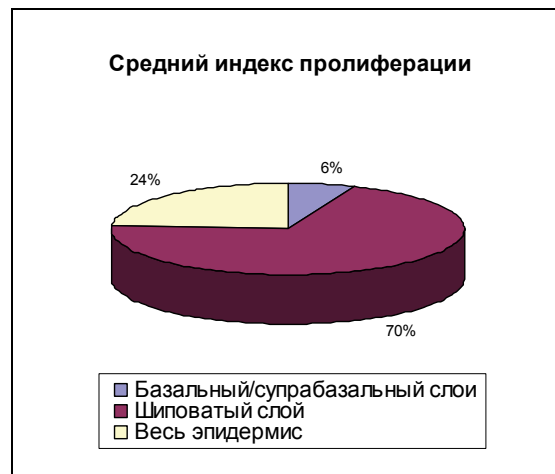


Рис. 4. Распределение Ki-67 позитивных клеток в эпидермисе.

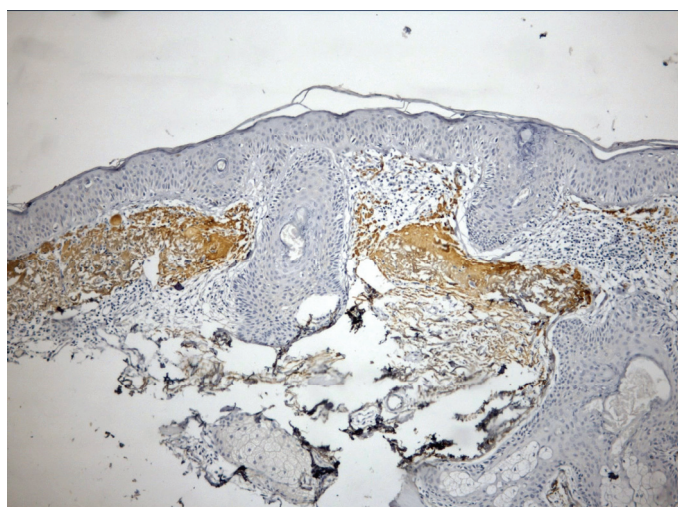


Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилином Майера. Распределение эластина в сосочковой и верхних отделах ретикулярного слоя дермы. $\times 200$.

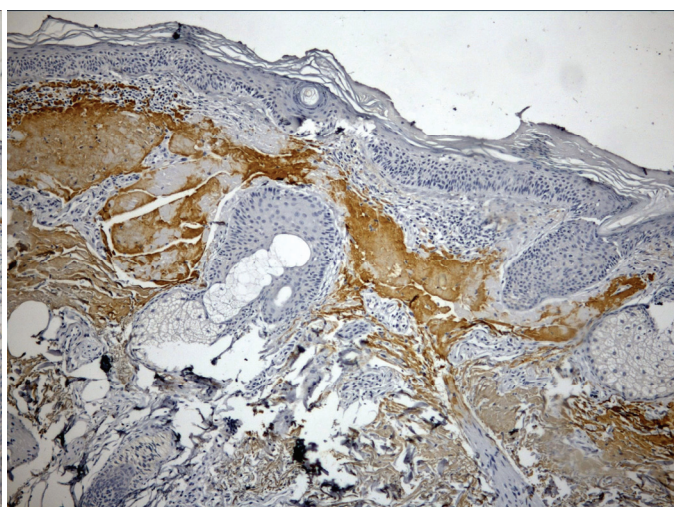


Рис. 6. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилином Майера. Распределение эластина до глубоких отделов ретикулярного слоя дермы. $\times 200$.

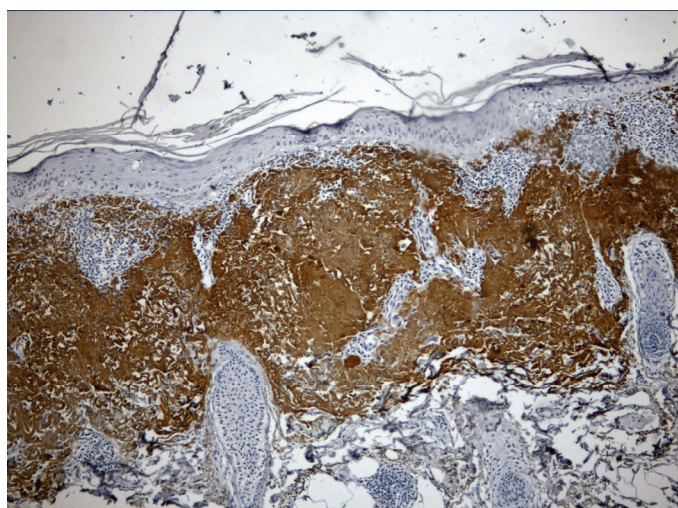


Рис. 7. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилином Майера. Распределение Ki-67 на всю толщину эпидермиса. $\times 400$.

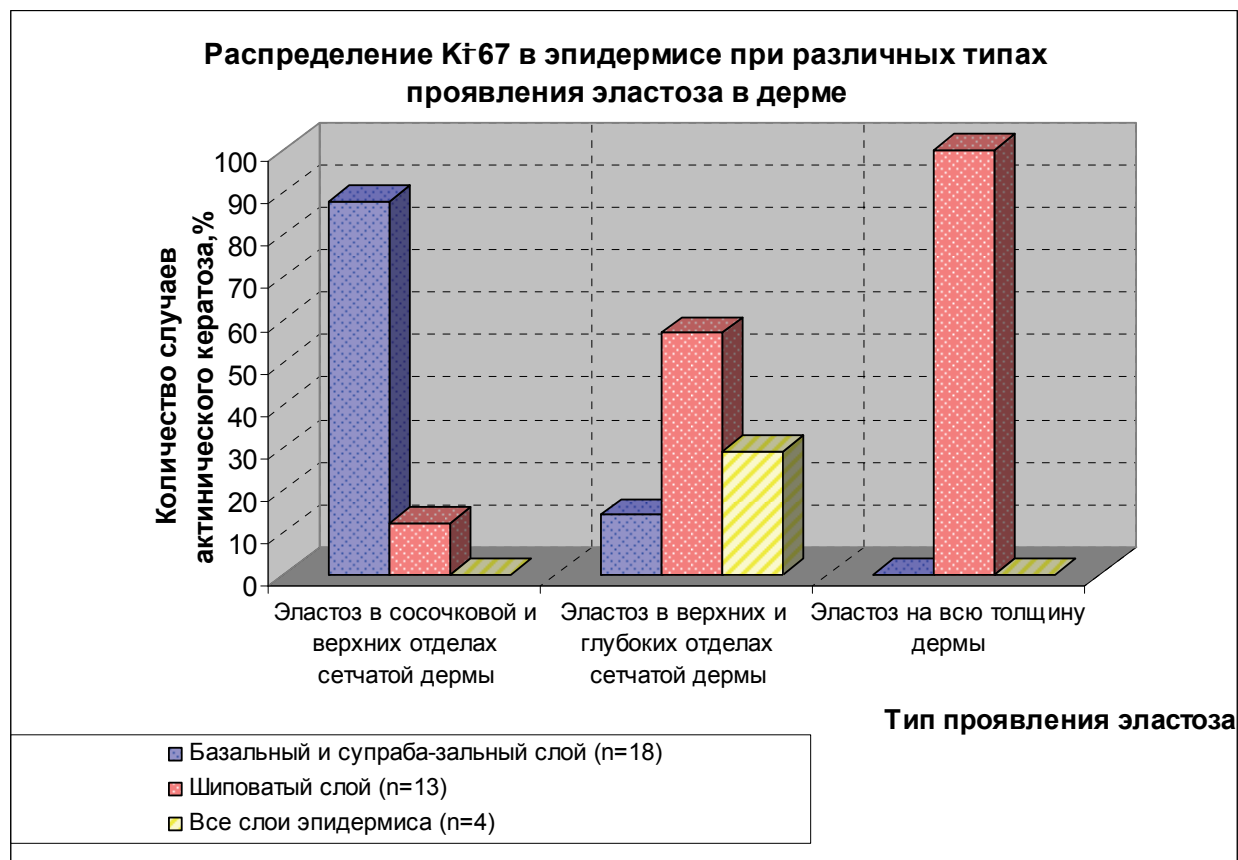


Рис. 8. Распределение Ki-67 в эпидермисе при различных типах проявления эластоза в дерме.

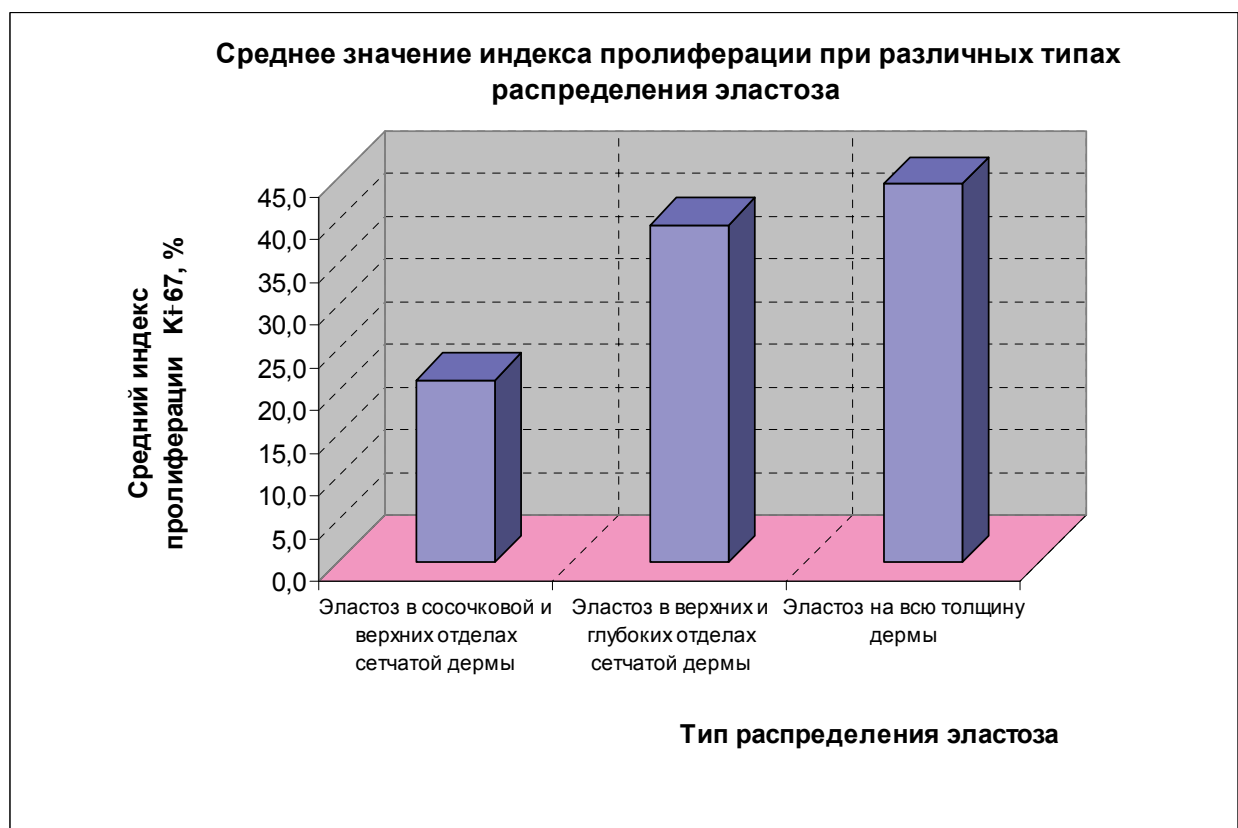


Рис. 9. Среднее значение индекса пролиферации при различных типах распределения эластоза.

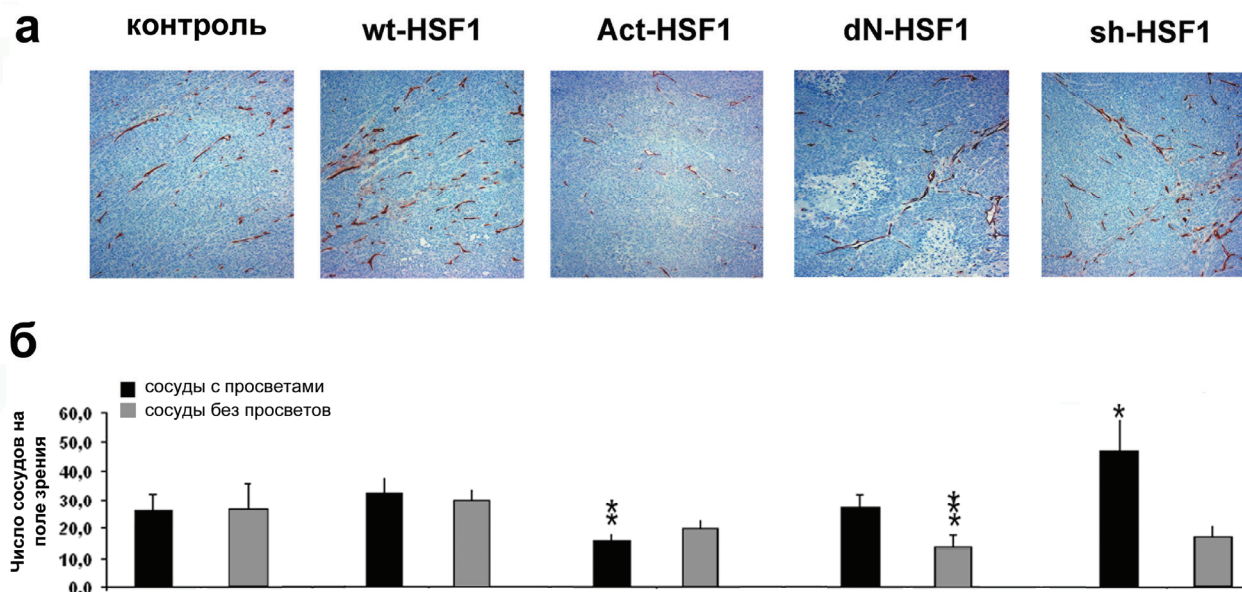


Рис. 3. Влияние трансдукции различных конструкций HSF1 на ангиогенез:

А: Иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей HCT116 антителами на CD34. Для каждой экспериментальной группы представлены типичные поля зрения.

Б: приведены результаты подсчета CD34 положительных структур (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,001$, t -тест Стьюдента).

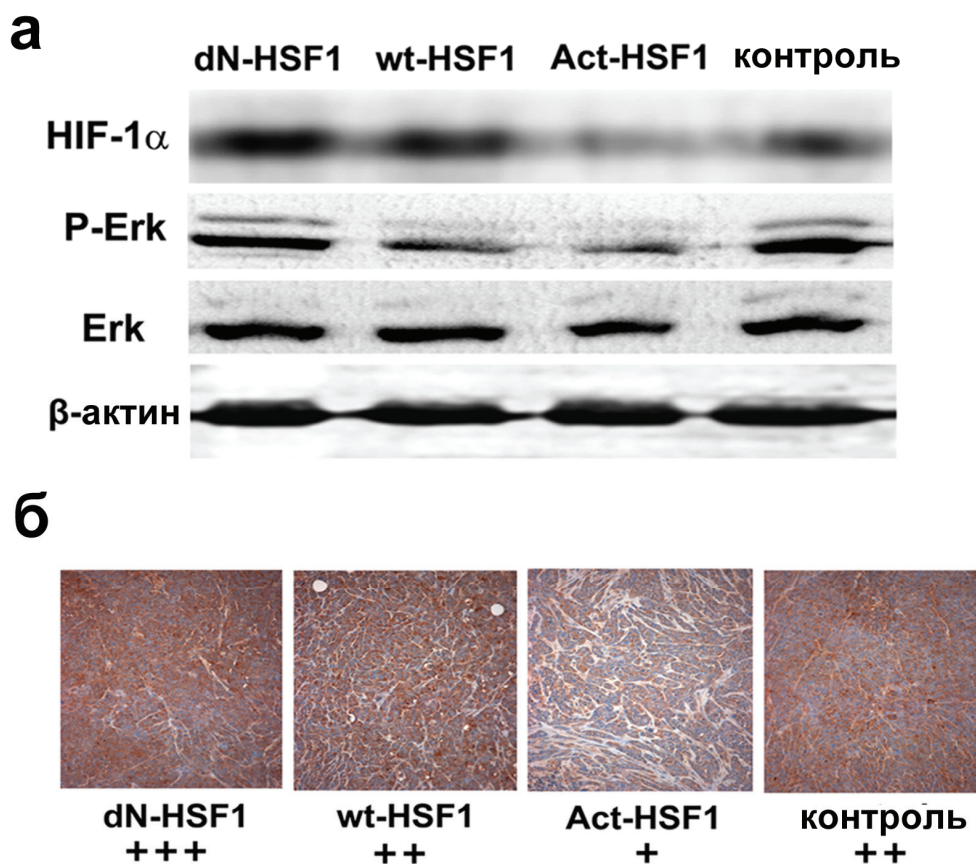


Рис. 4. Влияние трансдукции различных конструкций HSF1 на экспрессию белков Erk1/2 and HIF-1 α :

А: Вестерн-блот анализ клеточных культур. Представлены типичные результаты одного из трех экспериментов.

Б: Иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей антителами на HIF-1 α . Для каждой экспериментальной группы представлены типичные поля зрения. Для количественной оценки уровня экспрессии HIF-1 α ввели следующие обозначения: (+) – низкий, (++) – средний, (+++) – высокий уровень экспрессии.

Рисунки к статье А.И. Беришвили и соавт.

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С БЕЗРЕЦИДИВНОЙ И ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ БОЛЬНЫХ ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМОЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

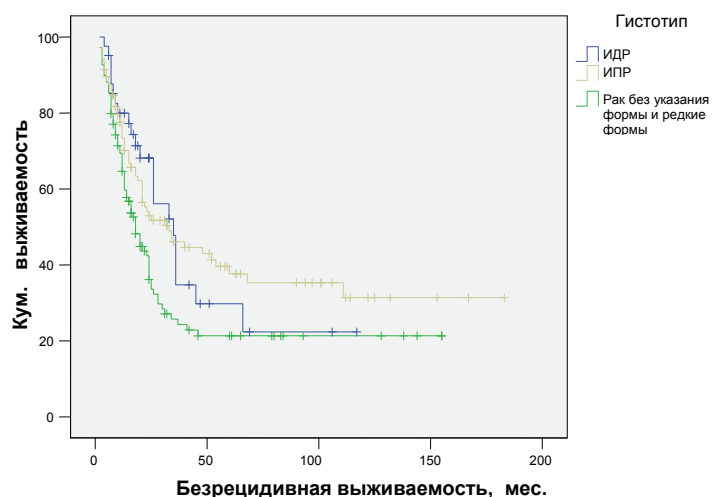


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных ОИФ РМЖ в зависимости от гистологического строения опухоли.

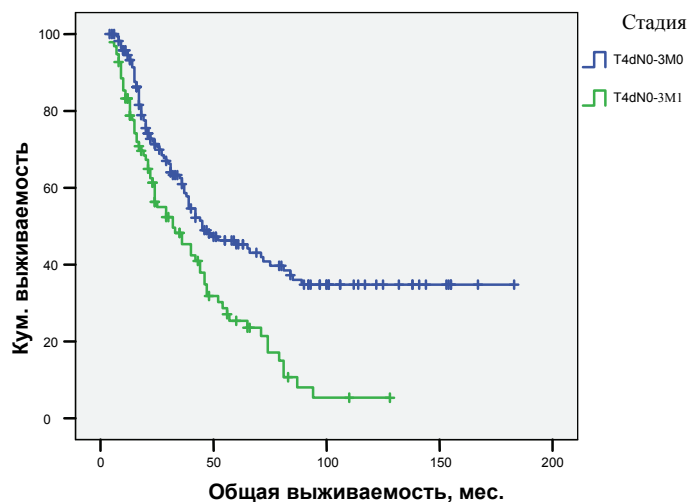


Рис. 2. Общая выживаемость больных ОИФ РМЖ в зависимости от стадии заболевания.

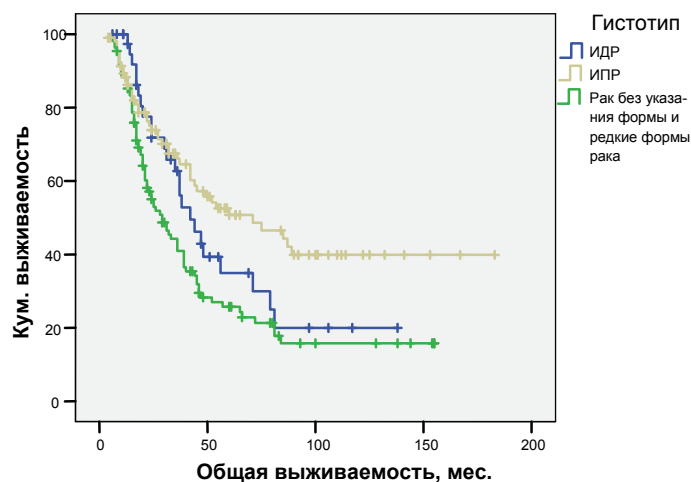


Рис. 3. Общая выживаемость больных ОИФ РМЖ в зависимости от гистологического строения опухоли.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ОБЪЕМА КОСТНОЙ ТКАНИ НА ВЕРХНЕЙ ЧЕЛЮСТИ (СРОК НАБЛЮДЕНИЯ ДО 21 МЕСЯЦА)

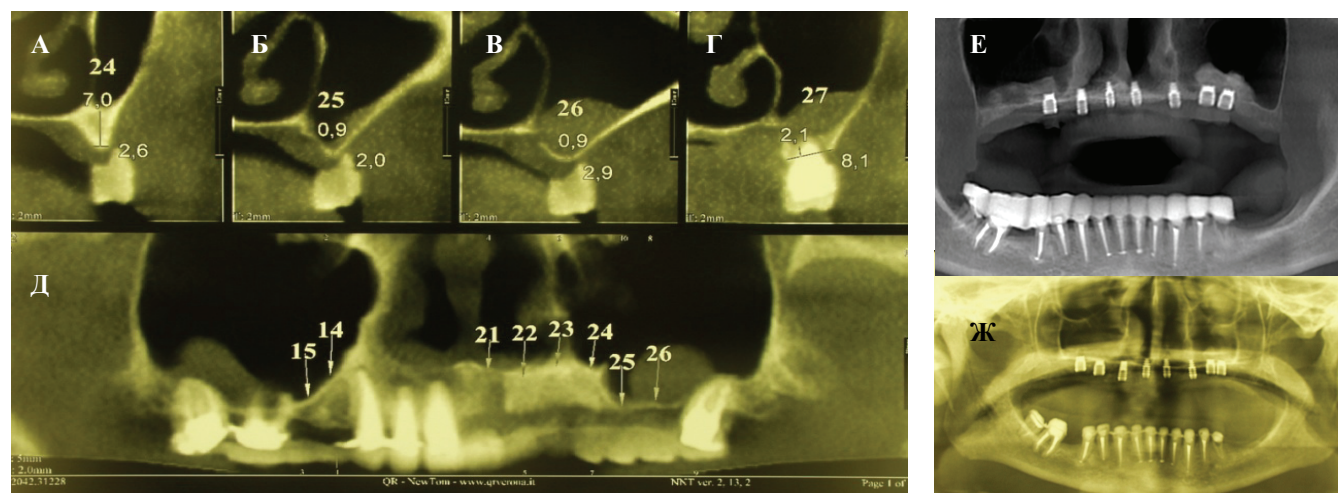


Рис. 1. Пациентка Р., 51 года. Диагноз: Частичная вторичная адентия.

КТ до начала лечения

А: сагиттальная проекция: атрофия альвеолярного отростка в области отсутствующих 14; 15; 25; 26 зубов. Измененная периодонтальная щель в области всех зубов (указано стрелками).

Б: фронтальная проекция: утолщение слизистой гайморовых пазух.

КТ в процессе лечения

В: сагиттальная проекция: после удаления зубов и трансплантации ТИК ЖТ в лунки удаленных зубов и в области дна верхнечелюстных пазух.

Г: фронтальная проекция: сформированная костная ткань, сливающаяся с костной тканью альвеолярного отростка. По плотности соответствует неизменной костной ткани (указано стрелками).

Контроль

Д: Панорамное изображение гистологической картины костного регенерата через 120 дней после трансплантации ТИК ЖТ. Костный регенерат представляет собой трабекулярную костную ткань. Окраска по Масону–Голднеру, $\times 50$.

Е: Ортопантомограмма через 4 мес. после трансплантации ТИК ЖТ и 1 мес. после дентальной имплантации.

Ж: КТ, фронтальная проекция, через 12 мес. после внутрикостной имплантации и 16 мес. после трансплантации ТИК ЖТ: в области проведенной трансплантации видна неизменная костная ткань (указано стрелками).

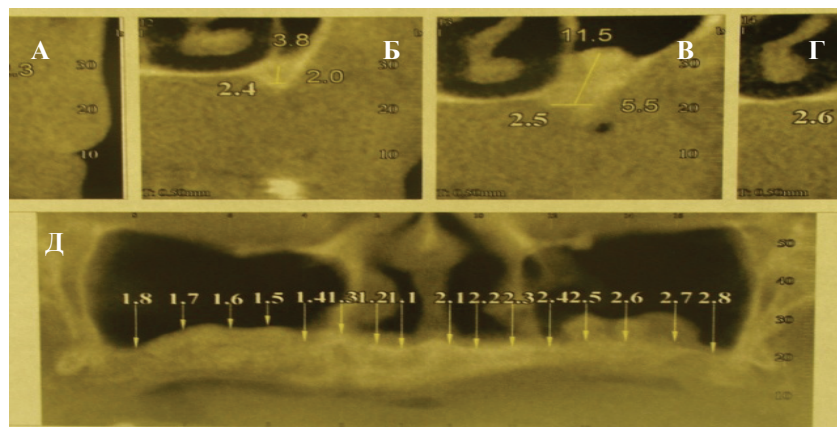


Рис. 2. Пациент Б., 53 лет. Диагноз: Частичная вторичная адентия.

КТ до начала лечения

А: дефект костной ткани в области вестибулярной кортикальной пластинки в проекции отсутствующего 16 зуба, медиальной стенки корня 17 зуба, далее дефект распространялся в область дна верхнечелюстной пазухи. Толщина костной ткани от верхушки 15 до нижней стенки пазухи около 2 мм. Толщина нижней стенки верхнечелюстной пазухи в области отсутствующего 16 – 1 мм.

КТ после лечения

Б: толщина костной ткани в области отсутст. 16 зуба 16 мм, 17 – 14 мм, от верхушки корня 15 – 6 мм.

Во время операции

В: удален 17 зуб, отсутствует межзубная костная перегородка между 16 и 17, сообщение костного дефекта с верхнечелюстной пазухой. Костные дефекты закрыты стружкой ТИК ЖТ.

Контроль

Г: Панорамное изображение костного регенерата пациента через 120 дней после трансплантации ТИК ЖТ. Костный регенерат представляет собой трабекулярную костную ткань. Окраска по Масону–Голднеру, $\times 50$.

Д: КТ во фронтальной проекции пациента Б. через 21 мес. после трансплантации ТИК ЖТ и 17 мес. после внутрикостной имплантации.

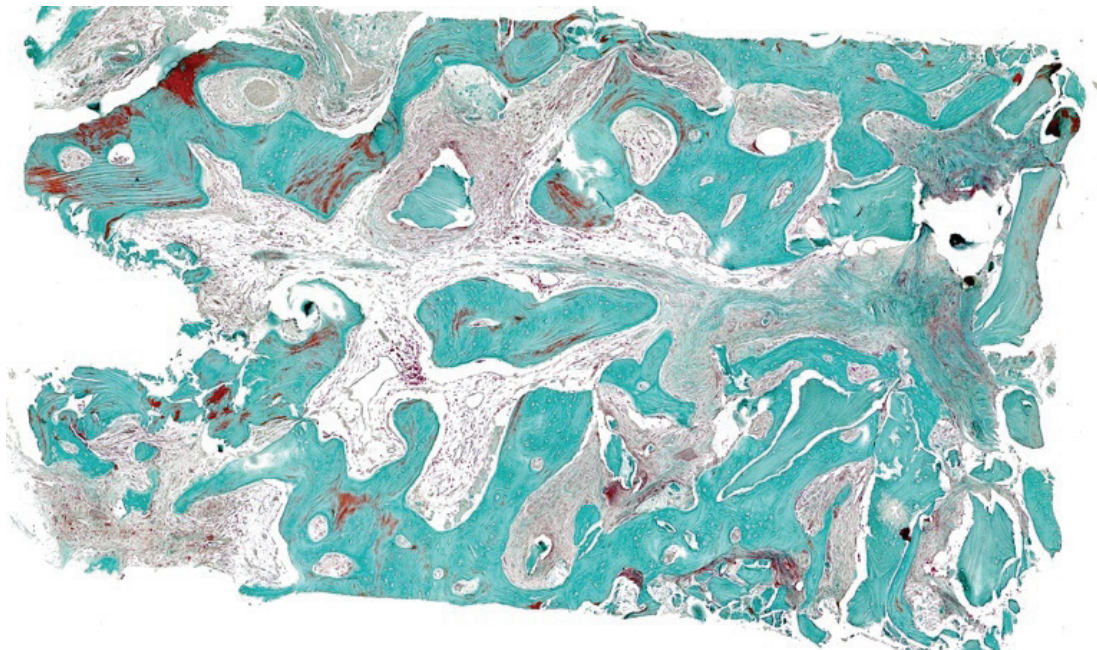
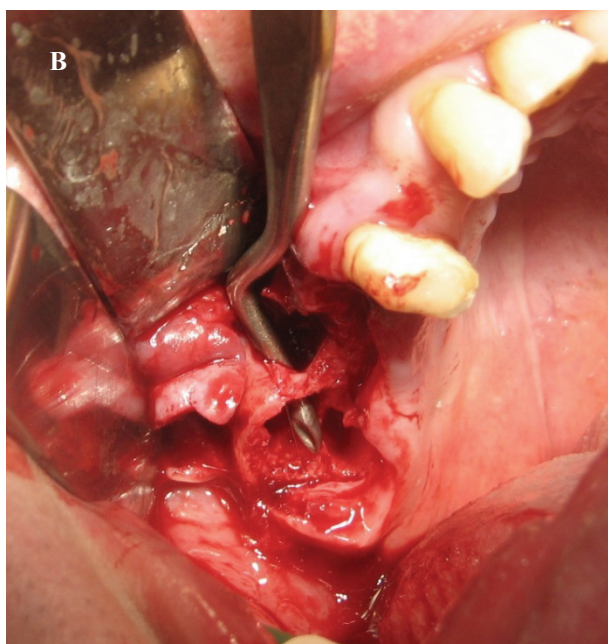
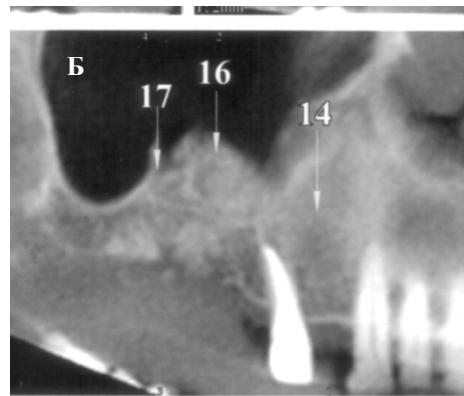
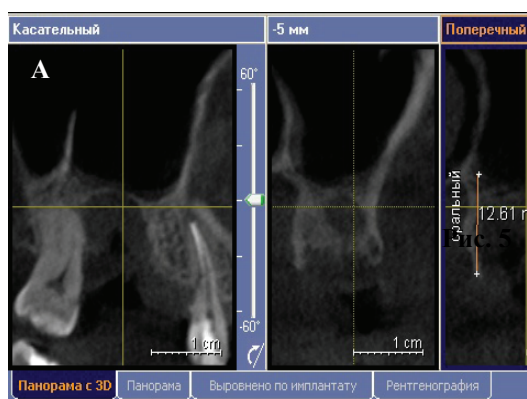


Рис. 3. Зоны образца.

- 1 – материнская кость,
- 2 – промежуточная содержащая между материнской костью и регенератом,
- 3 – регенерат.



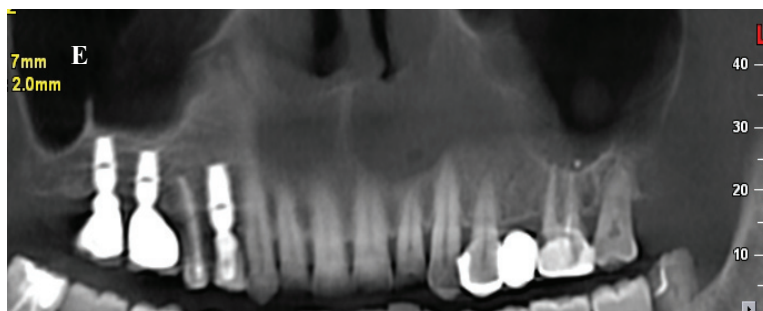
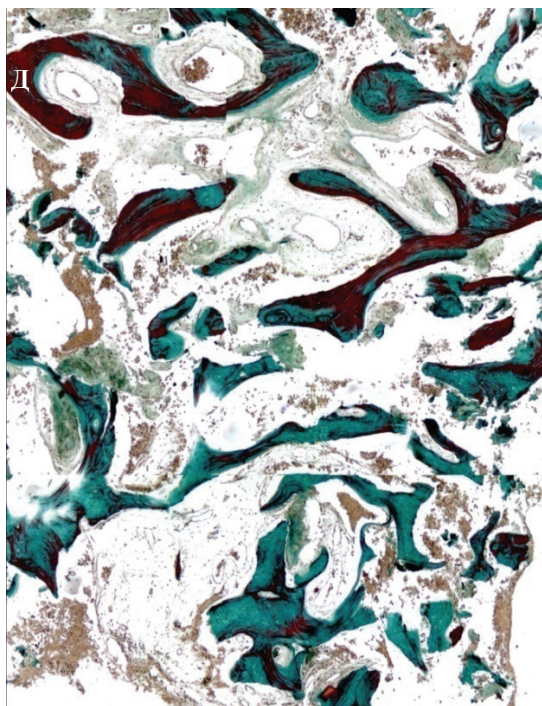


Рис. 4. Пациент Б., 53 года. Диагноз: Частичная вторичная адентия.

КТ до начала лечения

А: дефект костной ткани в области вестибулярной кортикальной пластинки в проекции отсутствующего 16 зуба, медиальной стенки корня 17 зуба, далее дефект распространялся в область дна верхнечелюстной пазухи. Толщина костной ткани от вершины 15 до нижней стенки пазухи около 2 мм. Толщина нижней стенки верхнечелюстной пазухи в области отсутствующего 16 – 1 мм.

КТ после лечения

Б: толщина костной ткани в области отсутст. 16 зуба 16 мм, 17 – 14 мм, от вершины корня 15 – 6 мм.

Во время операции

В: удален 17 зуб, отсутствует межзубная костная перегородка между 16 и 17, сообщение костного дефекта с верхнечелюстной пазухой.

Г: Костные дефекты закрыты стружкой ТИК ЖТ.

Контроль

Д: Панорамное изображение костного регенерата пациента через 120 дней после трансплантации ТИК ЖТ. Костный регенерат представляет собой трабекулярную костную ткань. Окраска по Массону–Голднеру, $\times 50$.

Е: КТ во фронтальной проекции через 21 мес. после трансплантации ТИК ЖТ и 17 мес. после внутрикостной имплантации.

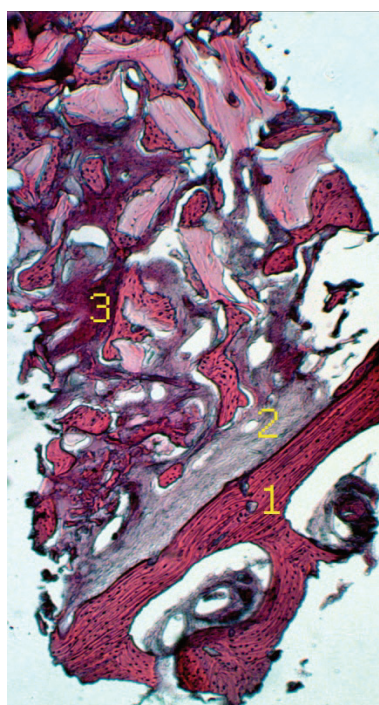


Рис. 5. Зоны образца.

- 1 – материнской кости,
- 2 – промежуточная, между материнской костью и регенератом,
- 3 – регенерата.