

**III Всероссийская научная конференция
с международным участием
«Наноонкология»,
САРАТОВ, 6-7 СЕНТЯБРЯ 2011 г.**

Глубокоуважаемые коллеги!

Нанотехнологическое общество России, Российская академия медицинских наук, РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН, Российская академия наук, Министерство промышленности и энергетики Саратовской области, Саратовский научный центр РАН, Учреждение РАН
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
ГОУ ВПО Саратовский Государственный Университет имени Н.Г. Чернышевского
ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
6-7 сентября 2011 года проводят

III Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Наноонкология»

Адрес проведения конференции: г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13. ИБФРМ РАН.

как доехать: от ж/д вокзала до ИБФРМ РАН:

марш. такси №№ 55А, 63 и 79 около 30 мин. до остановки «ул. Пензенская»

или от ж/д вокзала до остановки «проспект Кирова» (5 остановок): трол. № 15, марш. такси №№ 79, затем – авт. №№ 2, 2А, 6, 90, марш. такси №№ 21, 62, 83, 99 около 40 мин. до остановки «ул. Пензенская»

Расположение ИБФРМ РАН, вокзала и остановок транспорта можно посмотреть на интерактивной карте. Также на карте представлены основные достопримечательности г. Саратова и другая полезная информация.

На конференции будут представлены доклады ведущих ученых в области нанотехнологий Барышников А.Ю., Оборотовой Н.А., Швеца В.И., Хлебцова Н.Г., Терентюка Г.С., Дыкмана Л.А., Тучина В.В., а также специалистов из Научного Курчатовского Центра.

Основные научные направления конференции:

- нанобиотехнологии в диагностике онкологических заболеваний;
- нанофармация противоопухолевых препаратов;
- токсикология и фармакология наносомальных форм противоопухолевых препаратов;
- нанометрология;
- механизмы противоопухолевого действия нанопрепаратов;
- направленная доставка противоопухолевых препаратов;
- диагностики и терапия с использованием металлических наночастиц.

Тезисы докладов III Всероссийской научной конференции «Наноонкология» будут опубликованы в «Российском Биотерапевтическом Журнале». В регламенте конференции предусмотрены следующие формы предоставления материалов: пленарный, секционный, стендовый доклады.

Для участия в конференции необходимо прислать регистрационную форму в адрес Оргкомитета. Зарегистрироваться можно по Интернету на сайте www.ronc.ru, или выслать регистрационную форму и тезисы докладов по адресу Оргкомитета или по электронной почте: nanoconference2011@rambler.ru

Срок подачи заявки для участия с докладом до **01 июня 2011 г.**

Срок подачи тезисов до **01 июля 2011 г.**; регистрация участников до **20 июля 2011 г.**

По всем вопросам, связанным с участием в конференции, обращаться в Оргкомитет.

ISSN 1726-9784



РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
RUSSIAN JOURNAL of BIOTHERAPY
2/2011 ISSN 1726-9784



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal
of Biotherapy

2 / 2011

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№2 Том 10 2011 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

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

Редакционный совет

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

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Тел.: +7 (495) 323 57 00, +7 (495) 324 10 65; факс: +7 (495) 324 22 74;

E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru

Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 6 усл.-печ. листов,

подписано в печать 18.03.2011

Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел. +7 (495) 324 24 70; ronc@list.ru

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

Принт-менеджмент:

Типография «Огни Москвы»

Тел.: +7 (494) 933-87-78

info@ognimsk.ru, www.ognimsk.ru

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>К.В. Сытенкова, Н.И. Поспехова, И.В. Поддубная, Л.Н. Любченко</i> КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОМ И СПОРАДИЧЕСКОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	3
---	---

<i>Л.И. Короленкова, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников</i> МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АДГЕЗИИ, УТРАТЫ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ СВЯЗЕЙ, ИНВАЗИИ И НЕОАНГИОГЕНЕЗА КАК ФАКТОРЫ ПРОГРЕССИИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И РШМ	13
--	----

<i>К.А. Скрыпник, В.С. Косоруков</i> ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ГРАНУЛОЦИТАРНЫЙ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	19
--	----

<i>Н.Л. Шимановский, В.Н. Кулаков, Е.Ю. Григорьева, А.А. Липенгольц</i> НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ	25
--	----

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Ю.А. Рагулин, М.А. Каплан, В.Н. Медведев, Н.В. Афанасова, В.Н. Капинус</i> СОЧЕТАННАЯ ФДТ И ЛТ В ЛЕЧЕНИИ РАКА ЛЕГКОГО	33
--	----

<i>Я.А. Каинов, И.А. Фаворская, Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова, А.В. Комельков, Е.М. Чевкина</i> РОЛЬ БЕЛКА C9orf71 В ФОРМИРОВАНИИ ВЫСОКОМЕТАСТАЗНОГО ФЕНОТИПА RSV-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ СИРИЙСКОГО ХОМЯКА	37
--	----

<i>В.Л. Карапетян, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, С.О. Никогосян, В.В. Кузнецов</i> ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА (P53, BCL-2, BAX) И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКОВ РАННИХ СТАДИЙ	45
--	----

<i>К.С. Титов, М.В. Киселевский, Л.В. Демидов, В.Ю. Сельчук, А.Н. Грицай, Э.Х. Кучмезов</i> ВНУТРИБРЮШИННАЯ БИОТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И ДОНОРСКИХ ЛАК-КЛЕТОК ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКИХ АСЦИТАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ	51
--	----

<i>Н.А. Пятаев, П.И. Скопин, О.В. Минаева, С.А. Щукин, Е.Ю. Коровина, Н.Н. Зыряева</i> ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ДОКСОРУБИЦИНА ПРИ ВВЕДЕНИИ В ФОРМЕ КОНЬЮГАТА С ДНК У КРЫС С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМОЙ РС-1	55
---	----

<i>К.Р. Зейналова, Е.В. Степанова</i> МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РМЖ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ HER-2	61
--	----

<i>Н.И. Казачкина, А.А. Панкратов, Р.И. Якубовская, В.М. Негримовский</i> ИНДУКЦИЯ ПРОТОПОРФИРИНА IX В ТКАНЯХ МЫШЕЙ ПРИ НАРУЖНОМ ПРИМЕНЕНИИ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОСТАВЕ ВОДНЫХ ГЕЛЕЙ	67
---	----

<i>Т.А. Маньчева, Н.А. Плотникова</i> МЕЛАТОНИН И МЕТФОРМИН ПОДАВЛЯЮТ ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ ПРИ ИНДУЦИРОВАННЫХ БЕНЗ(А)ПИРЕНОМ НЕОПЛАЗИЯХ У МЫШЕЙ	73
--	----

<i>А.Ж. Муктубаева, Н.А. Шаназаров, А.Х. Сабилов, М.В. Антонов</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТИНА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА	79
---	----

<i>М.А. Сеньчукова, О.В. Мельников, Д.Ю. Воронов, Д.В. Глухов, С.О. Митряков</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОВЕДЕНИЯ ДО ОПЕРАЦИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ	81
--	----

<i>А.Г. Барышев</i> ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА В СВЕТЕ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛИ	85
--	----

Правила оформления статей для публикации в «Российском Биотерапевтическом Журнале»	49; 50; 54; 59; 60
---	--------------------

Информационное письмо № 1

III Всероссийская научная конференция с международным участием «Наноонкология», САРАТОВ, 6–7 СЕНТЯБРЯ 2011 г.	66; 71; 72 78; 88
--	-------------------

Памяти Самуила Петровича Ярмоненко	89
---	----

Список сокращений	91
--------------------------------	----

К 60-летию В.Н. Чарушина	93
---------------------------------------	----

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 618.19-006.6-02:616-056.7:577.113.3

*К.В. Сытенкова¹, Н.И. Поспехова², И.В. Поддубная¹ Л.Н. Любченко³***КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОМ И СПОРАДИЧЕСКОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**¹ГОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Росздрава, Кафедра онкологии, Москва²Медико-генетический научный центр РАМН, Москва³РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация:***Любченко Людмила Николаевна, д-р медицинских наук, заведующая лабораторией клинической онкогенетики НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-43-21;**e-mail:** clingen@mail.ru

Статья поступила: 16.01.2011, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Работа посвящена анализу проблемы наследственного и спорадического рака молочной железы и влиянию однонуклеотидных полиморфных вариантов в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53* на риск развития и клинические особенности наследственного рака молочной железы в современном аспекте.

Наследственный рак молочной железы – заболевание с выраженной генотипической и фенотипической гетерогенностью. Большая часть случаев наследственного рака молочной железы и яичников ассоциирована с мутациями в генах с высокой пенетрантностью (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*) и в генах средней и низкой пенетрантности: *CHEK2*, *PTEN*, *NBS1*, *ATM*. На сегодняшний день идентифицировано более 1536 различных полиморфизмов в гене *BRCA1* и около 1885 – в гене *BRCA2*. Однако их клиническая значимость освещена недостаточно, а результаты ряда исследований обосновывают необходимость и перспективность в изучении клинической значимости полиморфизмов в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53* в качестве модификаторов риска и молекулярно-диагностических маркеров рака молочной железы.

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы, спорадический рак молочной железы, однонуклеотидные полиморфизмы.

*K.V. Sytenkova¹, N.I. Pospekhova, I.V. Poddubnaya, L.N. Lyubchenko***CLINICAL FEATURES OF DIFFERENT GENOTYPIC VARIANTS, ASSOCIATED WITH HEREDITARY AND SPORADIC BREAST CANCER**¹Russian Medical Graduate Academy, Moscow²Medical Genetic Research Center of RAMS, Moscow³N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

The purpose of this study was to analyze the problem of hereditary and sporadic breast cancer, to estimate the influence of single nucleotide polymorphisms in *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* genes on the risk of the development and clinical features of hereditary breast cancer.

Hereditary breast cancer is a disease with a significant genotypic and phenotypic heterogeneity. Most of the cases of hereditary breast and ovarian cancer are associated with mutations in the highly penetrant genes – *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and in the low-penetrance genes, such as: *CHEK2*, *PTEN*, *NBS1*, *ATM*. Nowadays more than 1536 different polymorphisms in *BRCA1* gene and for about 1885 in *BRCA2* gene have already been identified. But their clinical significance is insufficient studied and the results of the number of the investigations, concerning single nucleotide polymorphisms in *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* genes prove the importance and opportunity to study their clinical significance as risk modifier and molecular diagnostic marker of hereditary breast cancer.

Key words: hereditary breast cancer, sporadic breast cancer, single nucleotide polymorphism.

Заболеемость раком молочной железы

Рак молочной железы является одним из самых распространенных онкологических заболеваний на сегодняшний день, поскольку среди женского населения в структуре заболеваемости ему принадлежит первое место в большинстве экономически развитых стран.

В мире ежегодно выявляется около 1,2 млн случаев этой патологии: в Европе эта цифра соот-

ветствует – 361 000, а в Северной Америке – 230 000 новых случаев в год. Число заболевших раком молочной железы год от года увеличивается примерно на 20 тысяч.

С начала 1990-х гг., благодаря ранней диагностике и адъювантной терапии РМЖ смертность во многих западных странах стабильно снижается, но все же рак молочной железы остается ведущей причиной смерти от онкологических заболеваний среди женщин.

В России в структуре онкологической заболеваемости женщин рак молочной железы занимает первое место. На сегодняшний день под наблюдением находятся около 500 000 женщин с диагнозом «рак молочной железы». В 2007 г. зарегистрировано 51 865 новых больных, а заболеваемость составила 42,7 случая на 100 000 населения. Максимальные показатели заболеваемости приходится на мегаполисы: так, по стандартизованному показателю заболеваемости раком молочной железы Москва занимает 4 место по России (52,3 на 100 000 женщин) из 79 регионов, а Санкт-Петербург – 7 место – 48,1 на 100 000 женщин. Также высокие показатели заболеваемости зарегистрированы в Чечне – 55,3 на 100 000 женщин, на Чукотке – 75,1 на 100 000, в Магаданской, Томской и Иркутской областях – 53,7; 50,7 и 49 на 100 000 женщин соответственно [1]. Низкие цифры заболеваемости характерны для республик Марий Эл – 31 на 100 000, Калмыкии – 30,4 на 100 000, Дагестана – 26,2 на 100 000 и Тывы – 18,7 на 100 000 [3]. На протяжении жизни 1 из 12 женщин в России имеет риск заболеть раком молочной железы, тогда как для США этот риск выше – 1 из 7.

В России в структуре онкологической заболеваемости смертность от РМЖ также находится на первом месте и составляет 17,4 %; так, в 2007 г. от рака молочной железы умерло 23 064 человека. Наибольшие показатели смертности отмечены в Москве и Московской области, Санкт-Петербурге, Чукотском автономном округе – от 20,9 до 34,4 на 100 000 женщин [1]. Нужно отметить, что заболеваемость и смертность от рака молочной железы за 30 лет выросли в 4 раза: так, в 1970 г. стандартизованные показатели заболеваемости и смертности на 100 000 населения составляли 9,6 и 4,2 [4]; в 2000 – 38,3 и 17 [3]; в 2003 – 38,7 и 17,4, а в 2007 году, как уже выше было отмечено, – 42,7 и 17,4 соответственно [1]. Именно поэтому рак молочной железы имеет большую социальную значимость, требует дальнейшего детального изучения и в зависимости от гетерогенности заболевания выбора метода диагностики, подбора специфического лечения и возможной профилактики в зависимости от индивидуального генотипа.

Наследственная предрасположенность

Еще в 100 году н.э. в древнеримской литературе описывались случаи заболеваемости раком молочной железы у близких родственников (мать, дочь, сестры, бабушка, тетя). А в 1982 W.A. Albano et al. выделили наследственный рак молочной железы в особую группу, в пределах которой существуют различные генетически детерминированные формы и синдромы [14]. Наличие наблюдаемой высокой частоты рака молочной железы в отдельных семьях стало основной причиной для генетической гипотезы и изучения этого заболевания.

На сегодняшний день в спектре рака молочной железы выделяют: спорадический, семейный и наследственный, или, как его еще называют, генетически детерминированный рак молочной железы. Стоит сразу сказать, что к пациенткам со спорадическим раком молочной железы, которых около 68 %, следует относить тех, у кого нет злокачественных опухолей в семейном анамнезе. Семейный рак (около 23 %) – это накопление случаев рака молочной железы в семье. Наследственный рак молочной железы (5–15 %) развивается как результат герминальных мутаций в генах предрасположенности, передающихся из поколения в поколение [21; 29; 43].

Наследственный канцерогенез рака молочной железы представляет собой повреждение генетиче-

ского аппарата клетки, передающееся из поколения в поколение. Установлено, что среди женщин, чьи кровные родственники по материнской линии страдали раком молочной железы, риск появления этого заболевания возрастает в 2–3 раза по сравнению с женщинами, не имеющими подобной наследственности. А в случае наличия рака молочной железы у родной сестры этот риск увеличивается в 8 раз. Стоит также отметить, что риск возникновения рака молочной железы тем выше, чем моложе заболевшая РМЖ родственница [30]. В настоящее время существует реальная возможность поиска и изучения генетических маркеров, указывающих на предрасположенность к раку молочной железы в определенных семьях.

Критерии постановки генетического диагноза наследственного РМЖ [2; 41; 43]:

- ранний возраст манифестации патологии;
- наличие двух и более родственников, страдающих раком молочной железы и/или раком яичника;
- двустороннее поражение;
- рак молочной железы у мужчины;
- специфические опухолевые ассоциации (генетически детерминированные формы, сочетающие РМЖ со злокачественными новообразованиями других органов);
- первичная множественность новообразований у пациента и/или его родственников.

Большим достижением в изучении этиологии и патогенеза наследственного рака молочной железы явилось открытие генов, структурно-функциональные перестройки и уровень экспрессии которых ассоциированы с этой формой заболевания. По праву их можно считать генетическими маркерами. Большая часть случаев наследственного рака молочной железы и яичников вызвана мутациями в высокопенетрантных генах *BRCA1* (17q21, Breast Cancer Associated gene 1), *BRCA2* (13q12.3, Breast Cancer Associated gene 2), *TP53* (17p13.1) и в генах средней и низкой пенетрантности: *CHEK2* (или *CHK2* – 22q12.1, Cell-cycle checkpoint kinase), *PTEN* (или *MMAC1*, или *TEP1* – 10q23.3, phosphates and tensin homolog), *NBS1* (или *NBN* – 8q21, Nijmegen breakage syndrome), *ATM* (11q22-q23, Ataxia-Telangiectasia Mutated locus), *CDH1* (16q22.1, E-кадгерин), *BRIP1* (17q22-q24), *STK11* (или *LKB1* – 19q13.3), *MLH1* (3p21.3), *MSH2* (2p22-p21), *ING4* (12p13.31) [28; 71; 76; 83; 98]. Если герминальные мутации в генах низкой пенетрантности (*ATM*, *PTEN*, *BRIP1* и других) увеличивают индивидуальный риск развития наследственного рака молочной железы менее чем в 2 раза, а в генах средней пенетрантности (*CHEK2* и других) от 2 до 5 раз, то мутации в генах высокой пенетрантности (*BRCA1/2*, *TP53*) повышают этот риск в 10 раз [87; 100]. Также следует отметить, что результаты многочисленных исследований генома констатируют рост числа аллельных вариантов, ассоциированных с низким риском возникновения рака молочной железы. Но подобные аллели встречаются относительно часто в популяции и поэтому их можно использовать для селективного скрининга пациентов с целью идентификации женщин с низким или средним риском развития РМЖ [22].

Особое внимание в структуре семейного рака молочной железы уделяется наследственным онкологическим синдромам, ассоциированным с высоким риском развития рака молочной железы, верификация которых проводится с помощью генетического и молекулярного исследований. Изучение этих синдромов позволяет понять механизм возникновения рака молочной железы, в основе которого лежат структурно-функциональные перестройки генов.

Синдром наследственного рака молочной железы и яичников (ССРМЖЯ или hereditary breast-ovarian cancer (HBOC), обусловлен мутациями в генах высокой пенетрантности – *BRCA1/2* и является причиной развития около 30 % случаев наследственного рака молочной железы [12].

Наследственный синдром «атаксия-телеангиэктазия» (синдром Луи-Бара) – аутосомно-рецессивное нарушение, которое развивается вследствие биаллельных мутаций гена *ATM* на 11 хромосоме. Этот синдром характеризуется прогрессирующей церебральной атаксией, нарушениями со стороны иммунной системы.

Синдром Коудена (синдром множественных гамартом), связан с мутацией в гене-супрессоре *P TEN*; женщины с этим синдромом имеют высокий риск развития рака молочной железы в течение жизни (20–50 %). Рак молочной железы у женщин с этим синдромом возникает примерно на 10 лет раньше, чем спорадический рак той же локализации [64]. Кроме того, синдром Коудена ассоциирован с высоким риском развития доброкачественных опухолей молочных желез (65 %), риском развития рака тела матки (5–10 %), рака и доброкачественных опухолей щитовидной железы [84] и риском развития рака молочной железы у мужчин [40].

Синдром Пейтца-Еггерса, связан с повреждением супрессорного гена *STK1*, увеличивающего риск заболеть раком молочной железы в течение жизни до 50 %. Основным его клиническим признаком является обнаружение множественных гамартомных полипов в пищеварительном тракте, что существенно увеличивает риск развития рака ободочной и прямой кишки; часто имеет место развитие рака яичников, тела матки, легких.

Синдром Ли-Фраумени включает спектр злокачественных новообразований различной локализации, в том числе одно- и двусторонний рак молочной железы. Развитие этого синдрома связано с мутациями в двух генах: *TP53* и *CHEK2*. У носителей мутантного гена *CHEK2* риск развития рака молочной железы повышен в 2–5 раз среди женщин и в 10 раз среди мужчин. А вероятность развития двустороннего рака молочной железы при этом синдроме, ассоциированном с мутацией гена *CHEK2*, составляет 26 % [29; 100].

Синдром Линч II связан с мутациями в нескольких генах, вовлеченных в репарацию ДНК – *MLH1*, *MSH2* и *MSH6*. У носителей мутаций в данных генах в 70–90 % случаев развивается рак толстой кишки, в 50 % случаев – рак матки, в 10 % – рак яичников и в 15–17 % случаев – рак молочной железы [84].

Мутации в генах, ассоциированные с развитием наследственного рака молочной железы, передаются из поколения в поколение, что позволяет при учете семей выявлять мутации у еще незаболевших носителей дефектных генов. Учитывая этот факт, трудно переоценить важность изучения подобных дефектов для сфокусированной адекватной профилактики и ранней диагностики РМЖ.

Значение генов *BRCA1* и *BRCA2*

Доказано, что гены *BRCA1* и *BRCA2* являются супрессорными генами с аутосомно-доминантным типом наследования, высокой пенетрантностью в пределах одной семьи [67].

Мутации в этих генах объясняют 36–90 % случаев наследственного рака молочной железы и яичников [65].

Ген *BRCA1* расположен на длинном плече 17 хромосомы (17q 12–21) и кодирует ядерный фосфо-белок, который участвует в репаративных процессах в клетке и в регуляции клеточного цикла. Кроме того, белковый продукт гена *BRCA1* репрессирует транскрипционную функцию гена рецепторов эстрогена, сдерживая избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстрогензависимых органов, особенно при половом созревании и беременности. Это первый ген, для которого было определено явное участие в этиологии семейного рака молочной железы [56]. Мутации в гене *BRCA1* в 45 % случаев ответственны за развитие только рака молочной железы, а более чем в 90 % случаев – за развитие рака молочной железы, сочетающегося с раком яичников. Риск развития рака во второй молочной железе у женщин с наличием мутации в гене *BRCA1* на протяжении жизни составляет 40–60 %, а рака яичников – 15–45 %. Повреждение гена *BRCA1* также увеличивает риск развития рака шейки и тела матки, рака поджелудочной железы и рака толстой кишки [57; 93].

Ген *BRCA2* находится на длинном плече 13 хромосомы (13q 12 – 27) и кодирует аминокислотную последовательность ядерного белка, который участвует в регуляции репарации ДНК и размножения клеток. Ген *BRCA2* «дикого» типа, как и ген *BRCA1*, выступает в качестве супрессора опухоли и обеспечивает целостность генома. Мутации в данном гене ответственны лишь за 35 % случаев семейной формы рака молочной железы, а также ассоциированы с раком молочной железы у мужчин – 6–7 % (что в 150–200 раз выше, чем в обычной популяции), раком яичников – 28 %, желудка, желчного пузыря, меланомой, раком предстательной и поджелудочной желез [51; 71; 82].

Риск развития рака молочной железы в течение жизни у женщин с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* составляет 67–87 % [19; 43; 68]; примерно 1 из 800 человек в общей популяции может нести патологическую мутацию в гене *BRCA1* [66; 77].

С учетом генотипических характеристик изучение прогностически значимых признаков определило фенотип BRCA-ассоциированного наследственного рака молочной железы [10; 61]:

- более молодой возраст заболевших (*BRCA1/2*),
- преобладание инфильтративно-протокового, медулярного и атипично-медулярного рака для носителей гена *BRCA1*,
- дольковый и тубуло-дольковый вариант опухоли для носителей *BRCA2*,
- высокая степень злокачественности опухоли (*BRCA1/2*),
- формирование выраженного лимфоцитарного инфильтрата вокруг опухоли (*BRCA1/2*),
- отрицательный рецепторный статус (*BRCA1*).
- Показано также, что сочетание экспрессии гена *BRCA1* в опухоли и герминальных BRCA-мутаций увеличивают риск развития наследственных форм рака молочной железы у женщин в более раннем возрасте: в 33–50 % случаев в возрасте до 50 лет и в 56–87 % – до 70 лет [21].
- *BRCA1*-экспрессирующие опухоли молочной железы характеризуются:
- низкой степенью дифференцировки,
- высоким ядерным индексом Блэка,
- низкой экспрессией циклина D1, p27 и АКТ,

- высоким уровнем GMP,
- сверхэкспрессией циклина E и p53,
- преобладанием инфильтративного протокового рака (93 %)
- «тройным»-негативным рецепторным статусом [61; 78; 80].

BRCA1-ассоциированные опухоли обычно характеризуются частой амплификацией гена *tus* и гена рецептора EGF.

С другой стороны, в литературе высказывается мнение о том, что экспрессия гена *BRCA2* увеличивает риск развития высокодифференцированных форм рака молочной железы с низким митотическим индексом до 85 % и положительным рецепторным статусом, с преобладанием тубуло-долькового инвазивного рака – 52 % [44; 61].

Следует упомянуть, что в некоторых случаях у больных-носителей мутаций в гене *BRCA2* имеет место необычно высокий уровень стероидных рецепторов в опухоли [28].

Интересно отметить сведения о том, что носители BRCA-мутаций имеют повышенный риск прогрессирования болезни не в виде метастатического поражения, а в виде развития вторых первичных ипсилатеральных и контралатеральных опухолей молочной железы – 39 и 64 % соответственно [21]. Так при определении частоты первично-множественных злокачественных образований в российской выборке больных, лечившихся в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, показано, что риск развития второй первичной опухоли молочной железы у пациенток с раком молочной железы, ассоциированным с мутациями в гене *BRCA2*, составляет 64 %, а риск развития после рака молочной железы рака яичника выше у пациенток-носителей герминальных мутаций именно в гене *BRCA1* и составляет – 28,6 % [8]. Что касается спорадического рака молочной железы, то считается, что он возникает чаще у женщин после 60 лет [84], не передается по наследству и риск возникновения контралатерального рака в данном случае минимален – 5–12 % [9].

Патологические аллельные варианты генов *BRCA1/2* и их сочетания могут выступать в некоторых случаях как в роли инактиваторов, так и модификаторов злокачественной трансформации [18; 47; 56]. Идентифицировано более 1536 различных мутаций или полиморфизмов в гене *BRCA1* и около 1885 в гене *BRCA2*, а также зарегистрировано более 600 различных миссенс-вариантов обоих генов, большинство выявлены единожды [19].

Распространенность этих мутаций зависит от этнической группы и географического региона, причем многие миссенс-мутации представлены в этих группах с очень низкой частотой. Специфические популяционные мутации были описаны преимущественно в семьях евреев-ашкенази (выходцы из Германии, большинство евреев Европы и Северной Америки):

1. В гене *BRCA1* -185delAG (делеция двух нуклеотидов аденина и гуанина в экзоне 2 гена *BRCA1* – мутация сдвига рамки считывания с образованием стоп-кодона 39). Данная мутация обнаруживается у 16 % женщин – евреек-ашкенази, страдающих раком молочной железы, и 39 % женщин, страдающих раком молочной железы и яичников, проявляющихся чаще в возрасте до 50 лет [86; 90].
2. В гене *BRCA2* – 6174delT (делеция одного нуклеотида – тимина – мутация сдвига рамки считывания) – имеет место у 8 % евреек-ашкенази, страдающих раком молочной железы и/или яичников [15; 91].

Другие специфические популяционные мутации отмечены в таких странах как Исландия – *BRCA2* 995del5, Нидерланды – *BRCA1* 2804delAA, Швеция – *BRCA1* 3171ins5 [39; 72], Италия – *BRCA1* 5083del19 и *BRCA2* 8765delAG [17; 74]. У русского населения, также как у венгерского и польского, частой является мутация в 20 экзоне гена *BRCA1* – 5382insC – мутация сдвига рамки считывания, которая приводит к образованию стоп-кодона 1829, тем самым приводя к дефекту (укорачиванию) белка [6]. Данная мутация в гене *BRCA1* составляет 80 % спектра мутаций в гене *BRCA1* и 60 % от общего спектра мутаций в генах *BRCA1/2* [9; 33; 48]. Ген *BRCA2* не имеет «горячих точек», мутации распределены по всей кодирующей части гена. В целом, в Европе популяционная частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* составляет от 0,2 до 2 %, то есть около 2 % населения Европы подвержены риску развития рака молочной железы только за счет именно этих мутаций. Многие авторы считают, что герминальные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* обуславливают предрасположенность к раку молочной железы и яичников в 27–70 % при двух синдромах: синдроме семейного рака молочной железы и синдроме семейного рака молочной железы/яичников [12]. Вместе с тем, установлено, что герминальные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* не объясняют весь спектр наследственных форм РМЖ и органов женской репродуктивной системы. У 20–55 % больных с другими семейными синдромами эти гены не выявляются.

Значение гена TP53

В настоящее время важная роль отводится гену *TP53*, участвующему в индукции и прогрессии опухолевого роста при раке молочной железы. Это ген-супрессор, который локализован на коротком плече 17 хромосомы (17p13.1), кодирует белок p53.

В норме *TP53* участвует в регуляции клеточного цикла, запускает апоптоз; мутация *TP53* регистрируется практически во всех видах опухолей, так 50–80 % различных солидных опухолей содержат мутации в гене *TP53*. Повреждение гена *TP53* не только способствует неопластическому росту, но и может быть связано с низкими показателями выживаемости, обусловленными устойчивостью к проводимому лечению [23].

Ген *TP53* стал одним из первых генов, утрата нормальной функции которого была обнаружена при наследственном онкологическом синдроме Ли-Фраумени (Li-Fraumeni) – синдроме с аутосомно-доминантным типом наследования, характеризующимся высокой частотой возникновения различных типов опухолей: сарком мягких тканей, остеогенной саркомы, опухолей головного мозга, острых лейкозов, рака надпочечников в сочетании с раком молочной железы [63].

В литературе отсутствует единая точка зрения относительно частоты встречаемости опухолей при мутациях в гене *TP53*. Ранее считалось, что мутации в гене *TP53* объясняют менее 1 % всех наследственных форм рака молочной железы, но недавние исследования показали, что на их долю приходится гораздо большее количество случаев этой патологии, особенно, если речь идет о возникновении заболевания в раннем возрасте – до 30 лет [31; 81; 94].

Существует мнение, что во многих случаях рака молочной железы ген *TP53* не поврежден, но, с другой стороны установлено, что в некоторых ситуациях уровень белка MDM2 увеличивается и он связывается с белком p53, ингибируя его противоопухолевую активность.

Это стимулирует рост злокачественных опухолевых клеток в ткани молочной железы и ингибирует путь апоптоза, индуцируемый p53 [88].

Доказано, что в случае наличия мутации в данном гене, риск развития рака молочной железы увеличивается на 30–40 %. Мутантный ген *TP53* экспрессируется в разных клинико-морфологических вариантах РМЖ с неодинаковой частотой: в 50 % случаев при метастатическом раке молочной железы, в 25 % – при инвазивном раке молочной железы и в 13–20 % случаев при протоковом раке *in situ* и характеризуется плохим прогнозом [5].

Структурные перестройки и полиморфные варианты генов *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53*

В настоящее время проводится много исследований по изучению влияния частых низкопенетрантных однонуклеотидных полиморфизмов различных генов на риск развития рака молочной железы. Однонуклеотидные полиморфизмы или *Single nucleotide polymorphism (SNP)* – это отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме представителей одного вида или между участками гомологичных хромосом индивида. Для определения генетических локусов, ассоциированных с развитием спорадического рака молочной железы, было изучено более 220 000 однонуклеотидных полиморфизмов в различных генах и обнаружено 5 независимых локусов с тесной связью возникновения РМЖ [38]. В другом исследовании определяли гены-кандидаты на ассоциацию с развитием рака молочной железы: анализировано 710 однонуклеотидных полиморфизмов в 120 генах с заведомо известной функцией у 4400 больных РМЖ и в равной по объему контрольной выборке женщин. В результате были определены относительные риски развития рака молочной железы. Наиболее значимыми представляются аллельные варианты в генах, регулирующих клеточный цикл, вовлеченных в метаболизм стероидных гормонов и выполняющих сигнализирующую о повреждении ДНК функцию [73]. В последнем исследовании С. Turnbull et al. проанализировано 582,886 однонуклеотидных вариантов. Обнаружено еще 5 новых локусов в 9; 10 и 11 хромосомах и идентифицированы однонуклеотидные варианты в 6 и 8 хромосомах, имеющие более значимую ассоциацию с риском возникновения рака молочной железы, чем многие другие изученные в предыдущих исследованиях [96]. Эти результаты смогут помочь правильно сориентировать исследователей и врачей, в каком направлении следует двигаться в дальнейшей идентификации «чувствительных» аллелей.

За последние 10 лет появилось много работ, идентифицирующих новые однонуклеотидные полиморфизмы и гаплотипы в *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* и других генах, ассоциированных с риском возникновения рака молочной железы и оценивающих их клиническую значимость. Отмечено, что большое значение в развитии наследственного рака молочной железы имеют определенные однонуклеотидные полиморфные варианты генов-супрессоров *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53*.

BRCA2 – один из крупнейших протеинов у человека, имеющий несколько высококонсервативных сайтов. Миссенс-варианты в гене *BRCA2* являются наиболее частыми изменениями и составляют 54% всех мутаций, о половине из них сообщается лишь единожды. Ассоциация с предрасположенностью к раку молочной железы доказана только для небольшого числа вариантов. Так, в гене *BRCA2* большое значение уделяется миссенс-варианту Ex10+321A>C

(rs144848) – N372H (Arg372His) в 10 экзоне – это полиморфизм в гене, приводящий к замене кодируемой аминокислоты, частота его встречаемости по редкому аллелю 372H довольно высока во всех популяциях и превышает 10 %. Замена аминокислоты N372H касается региона белка *BRCA2* (290–453 аминокислотных остатка), взаимодействующего с транскрипционным коактиваторным белком P/CAF (p300/CBP-Associated Factor), обладающим гистон ацетилтрансферазной активностью для активации транскрипции других генов [45]. В исследовании, проведенном РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН совместно с МГНЦ РАМН для изучения полиморфизма N372H, было генотипировано три группы пациентов: семейно-отягощенные *BRCA1* и *BRCA2*-негативные больные раком молочной железы; больные со спорадическим раком молочной железы (без семейных случаев РМЖ); контрольная группа здоровых женщин. Результаты показали, что частота гомозиготного варианта N372H в группе семейного рака молочной железы в два раза превышает таковую в контрольной группе, она выше и в группе со спорадическим раком. Аллельная частота минорного гомозиготного варианта 372H также выше в группах больных РМЖ (неопубликованные данные). По результатам многих исследований гомозиготный HH-аллельный вариант (372H/H) ассоциируется с повышенным риском развития рака молочной железы в 1,3–1,5 раза по сравнению с среднепопуляционным и увеличивает риск развития рака яичников (этот вариант может объяснить около 2 % случаев возникновения рака яичников) [16; 50; 52; 85; 89]. В отличие от женщин мужчины чаще являются носителями гомозиготного варианта. Соответственно, они обладают повышенным риском развития РМЖ, особенно если их возраст меньше 60 лет [70].

Высказывается мнение, что аминокислотная замена в 2 экзоне гена *BRCA2* – 203 G/A в 5'-нетранслируемой области (Ex2+14G/A, rs1799943), также ассоциируется с повышенным риском развития рака молочной железы и яичников у носителей мутаций в гене *BRCA1*. Эти данные также требуют дальнейшего детального изучения для создания правильного подхода к диагностике, лечению и профилактики рака молочной железы, связанного с данной миссенс-мутацией.

Последовательность гена *BRCA1* очень вариабельна; вероятно, некоторые его участки имеют незначительную структурную консервативность, и аминокислотные замены внутри них не оказывают влияния на функциональную активность белка. В то же время имеются высококонсервативные участки, например, домены RING-finger и BRCT. Миссенс-варианты внутри этих доменов с большей вероятностью ассоциированы с предрасположенностью к раку молочной железы, чем мутации, расположенные в других участках. Несколько менее консервативная последовательность белка кодируется 11 экзонами гена. Установлено, что в гене *BRCA1* присутствует гаплотип из 11 однонуклеотидных полиморфных вариантов (IVS1-103T/C – 1 интрон, IVS1-115T/C – 1 интрон, IVS8-58delT – 8 интрон, S694S – 11 экзон, L771L – 11 экзон, P871L – 11 экзон, E1038G – 11 экзон, K1183R – 11 экзон, S1436S – 13 экзон), которые находятся почти в полном неравновесии по сцеплению по отношению друг к другу и наследуются как цепи. Их делят на два основных гаплотипа, названных: гаплотип А и гаплотип В [5]. Гаплотип А более частый вариант. При исследовании пробандов семей со случаями рака молочной железы установлено, что имеется ассоциация между гомозиготным вариантом N372H в гене *BRCA2* и гаплотипом

В в гене *BRCA1*, а при дальнейшем исследовании обнаружено, что носительство гетерозиготного генотипа AB – N372H связано с высоким риском развития рака молочной железы [12]. Однако клиническая значимость этих гаплотипов не определена.

Проведенные российскими и иностранными авторами исследования по оценке клинической значимости вышеуказанных аллельных *BRCA* вариантов были направлены на оценку возраста, менструального статуса, связи применения гормонозаместительной терапии с последующим риском развития рака молочной железы, морфологических характеристик опухолей и риска развития рака молочной железы у мужчин-носителей. В этих работах было отмечено, что гомозиготный вариант N372H гена *BRCA2* на 30 % увеличивает риск развития рака молочной железы у женщин моложе 45 лет (что предположительно связано с высоким уровнем стероидных гормонов в молодом возрасте), особенно в таких странах как Великобритания, Финляндия, Германия, Австралия [50; 89], но подобной тенденции не отмечено, например, в Японии и США [46; 54]; также N372H вариант является причиной развития рака яичников у женщин, проживающих в Австралии и Великобритании [16], чего опять же не отмечено у женщин на территории США [101]. Что касается гетерозиготного N372H варианта, то мужчины с наличием подобного полиморфизма часто страдают (первичным) бесплодием, азооспермией или тяжелой формой олигозооспермии (олигоспермии) [102].

При изучении гена *TP53* получены данные о наличии полиморфизмов, также ответственных за риск развития рака молочной железы. В целом, в гене *TP53* выявлено около 80 полиморфизмов. Наиболее информативным считается однонуклеотидный полиморфизм Ex4+119 G>C (*Arg72Pro*, rs1042522), где имеет место замена аргинина на пролин в 72 кодоне 4 экзона. Это ведет к трансляции двух функционально и биохимически разных вариантов белка p53: с аргинином или пролином в 72-м кодоне области, богатой пролиновыми остатками, которая вовлечена в апоптотическую деятельность p53. В ряде клинических исследований было показано, что полиморфные варианты p53Arg и p53Pro обладают различными функциональными свойствами: в частности, форма 72Arg p53 значительно более эффективно, чем форма 72Pro запускает запрограммированную клеточную смерть. Кроме того, в опухолевой ткани при раке молочной железы установлена потеря аллеля C гена *TP53*, кодирующего более функциональный в плане трансактивации и репарации ДНК белок p53Pro [20; 35; 60]. Установлено, что полиморфизм *Arg72Pro* гена *TP53* вносит значительный вклад в развитие локорегионарного метастазирования: при генотипе *Arg/Arg* РМЖ чаще характеризуются мультицентрическим характером роста и имеет повышенный риск развития отдаленного метастазирования, тогда как при генотипе *Pro/Pro* РМЖ характеризуется низкой частотой лимфогенного метастазирования и уницентрическим ростом, что означает умеренную злокачественность опухоли и более благоприятное клиническое течение заболевания [35]. В тоже время по данным других исследований не было выявлено ассоциации между полиморфизмом *Arg72Pro* и возникновением наследственного рака молочной железы [21; 95; 99]. В нескольких исследованиях было отмечено, что наличие полиморфизма *Arg72Pro* (*Pro/Pro* генотип) ассоциируется с риском возникновения наследственного рака молочной железы или рака яичников в раннем возрасте (до 35 лет) у женщин-носительниц мутации в гене *BRCA2* в Испании [69] и женщин-носительниц мутации в гене

BRCA1 в Канаде [27]. Причем в Канаде женщины-носительницы мутации в гене *BRCA2* и гомозиготного полиморфизма *Pro72Pro* характеризуются значительно более старшим возрастом развития рака молочной железы [27].

Изучается роль другого полиморфизма в гене *TP53* – dup16bp (rs17878362), который впервые был описан V. Lazar et al. в 1993 г. Полиморфизм характеризуется дупликацией 16 пар нуклеотидов в 3 интроне (5'-gacctggaggctggg-3', нуклеотиды с 11951 по 11966; [62]). Но результаты нескольких исследований дают достаточно противоречивые выводы в отношении риска развития рака молочной железы, ассоциированного с этим полиморфизмом [24; 32; 36; 99]. В исследовании S. Wang-Gohriek et al. установлено, что полиморфизм dup16bp гена *TP53* значительно увеличивает риск возникновения наследственного рака молочной железы у женщин к 50 годам [99]. В другом исследовании S. Costa et al. показывают, что полиморфизм dup16bp является фактором риска развития как наследственного, так и случаев спорадического рака молочной железы. Более того, этот полиморфизм, как и полиморфизм *Arg72Pro*, ассоциируется с высоким риском возникновения лимфатического метастазирования при раке молочной железы [32]. В то же время, в другом исследовании G. De Vecchi et al. не было выявлено связи ни полиморфизма ins3 dup16, ни *Arg72Pro* с вероятностью возникновения наследственного рака молочной железы как у носителей мутаций в генах *BRCA1/2*, так и у женщин без структурных перестроек этих генов [36].

Интересные результаты были получены в исследовании, проведенном В.М. Перельмутером и соавт., в которое были включены 525 женщин (от 35 лет и старше) с инфильтративным раком молочной железы. Данные показали, что у женщин в менопаузе имеет место модифицирующее влияние носительства мажорных аллелей гена *TP53*, а именно, функционально значимого полиморфизма *Arg72Pro* и его сочетание с функционально полноценными генотипами интрона 3 dup16 и интрона 6 G13494A, (rs1625895), что значительно повышает риск развития рака молочной железы [11].

Накопление стареющих клеток ведет к дегенерации и изменению функции ткани, приобретению клетками микроокружения способности к промоции опухолевого фенотипа. Высокая активность белка p53 защищает от злокачественной трансформации в раннем возрасте, но ускоряет приобретение фенотипа старения и связанного с этим развития рака молочной железы в пожилом возрасте [79]. Все вышесказанное указывает на существование различных механизмов вовлечения гена *TP53* в патогенез рака молочной железы у женщин репродуктивного и менопаузального возрастов. Многие авторы считают, что распространенные аллели генов, в том числе *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53*, влияние которых на риск развития РМЖ невелико, при сочетании с другими аллелями низкой пенетрантности могут существенно увеличивать риск развития рака [13; 15; 56]. Так, была предложена полигенная модель развития семейного рака молочной железы, предполагающая ассоциированное влияние на риск развития онкологических заболеваний полиморфных вариантов ряда генов, белковые продукты которых взаимодействуют друг с другом при выполнении взаимосвязанных функций [75]. Выраженная тканевая специфичность опухолей при мутациях в генах *BRCA1* и *BRCA2* свидетельствует об участии этих генов в развитии как наследственного, так семейного и спорадического рака молочной железы. Некоторые герминальные миссенс-мутации и полиморфные варианты этих генов являются низкопенетрантными аллелями риска развития рака молочной железы [47; 56; 89].

Безусловно, для раннего выявления и профилактики развития наследственного РМЖ большое значения придается скрининговым программам, химиопрофилактике, соблюдению или при необходимости изменению образа жизни и репродуктивного поведения, различным лечебным мероприятиям, но не стоит забывать о клинической значимости однонуклеотидных полиморфизмов генов *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53*, ассоциированных с достаточно высоким риском возникновения наследственного варианта рака молочной железы. Данные многих исследований указывают на необходимость и перспективность изучения клинической значимости однонуклеотидных полиморфизмов этих генов в качестве модификаторов риска. Важен также тот факт, что вероятность наследования потомством мутаций и аллельных вариантов, ассоциированных с риском развития наследственного РМЖ, составляет 50 %. Наследование происходит по обеим линиям. Интересно и то, что наличие полиморфных вариантов в гене *BRCA2* способно воздействовать на внутриутробную выживаемость плода в зависимости от пола [50; 92].

В других исследованиях [34; 59] также отмечено неравномерное соотношение пола новорожденных, чьи матери являлись носительницами различных аллельных вариантов в *BRCA1* и *BRCA2*, что возможно связано с пренатальной выживаемостью. Установлено, что новорожденные девочки с гетерозиготными вариантами полиморфизмов *BRCA1* рождаются со значительно меньшей массой тела [53; 55]. В США проанализированы случаи отсутствия беременности у женщин после ЭКО и переноса эмбриона. Выяснилось, что гомозиготный вариант Pro/Pro72 полиморфизма Arg72Pro *TP53* является причиной угрозы прерывания беременности после ЭКО [58].

Перспективы ЛТ наследственного РМЖ

Согласно данным последних исследований, прогноз течения рака молочной железы у пациенток с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* незначительно отличается от прогноза течения sporadического рака молочной железы. Высказывается мнение о том, что наличие мутаций в этих генах является фактором, прогнозирующим химиочувствительность опухоли. Как показали недавно выполненные исследования, клетки с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* чувствительны к препаратам платины, что требует детального изучения и говорит о возможности применения платиносодержащих препаратов у женщин с наследственным РМЖ [25; 26; 42].

Литература

1. Аксель Е.М., Давыдов М.И. Статистика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в 2008 году. – Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2008 г. – М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2009. – С. 85–106.
2. Гарькавец Р.Ф., Казубская Т.П., Любченко Л.Н. Наследственный рак: идентификация, генетическая гетерогенность, медико-генетическое консультирование // Вестн. РАМН. – 2001. – 9. – С. 27–32.
3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004 г. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина. – 2006. – Т. 17, № 3.
4. Злокачественные новообразования в СССР и союзных республиках «Статистический справочник» в 2 частях. Под редакцией Н.Н. Трапезникова, Г.Ф. Церковного, Б.В. Билетова, В.В. Двойрина. – М.: Медицина, 1989.
5. Карпунин А.В., Логинова А.Н., Хомич Е.Н., Поспехова Н.И. Наследственная предрасположенность к раку молочной железы // Мед генет. – 2002. – 1(6). – С. 254–61.
6. Карпунин А.В., Поспехова Н.И., Музаффарова Т.А. и др. Молекулярная диагностика моногенных форм рака // Медицинская генетика. – 2006. – 5(прил. 2). – С. 2–7.
7. Любченко Л.Н., Гарькавец Р.Ф. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование при наследственных формах рака молочной железы. – В кн.: Рак молочной железы / Под ред. Н.Е. Кушлинского, С.М. Портного, К.П. Локтионова. – М., 2005. – С. 198–209.

Наличие выраженного лимфоцитарного инфильтрата, обнаруженного у пациентов с BRCA-ассоциированным раком молочной железы, может отражать иммунологические характеристики опухоли и указывать на возможность применения в будущем иммунотерапии и иммунопрофилактики наследственного варианта рака молочной железы [7]. Так, например, некоторые авторы считают перспективным использование ингибиторов PARP (Poly(ADP-ribose) Polymerase) в качестве терапевтических агентов у пациенток с наследственным раком молочной железы и яичников (BRCA-ассоциированным).

PARP-ингибиторы блокируют путь репарации одонитевых разрывов ДНК и приводят к апоптозу в BRCA-дефицитных опухолевых клетках, которые уже имеют дефицит репарации путем гомологичной рекомбинации [37; 42; 80]. В настоящее время в некоторых учреждениях в рамках профилактических терапевтических подходов у пациенток с высоким риском развития наследственного рака молочной железы применяют антиэстрогенные препараты [49; 97], а в перспективе планируется использование ингибиторов PARP [80].

До сих пор не поставлена точка в выборе режимов химиотерапии для пациентов с BRCA-ассоциированным РМЖ. Поэтому на сегодняшний день при выборе адъювантной химиотерапии для лечения данной категории больных используют стандартные прогностические факторы.

Заключение

Обзор представленных данных, неоднозначность полученных результатов, возможности новых терапевтических подходов обосновывают необходимость дальнейшего изучения клинической значимости полиморфизмов и их ассоциаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53*, связанных с развитием РМЖ. Медико-генетическое консультирование, усовершенствованное с учетом молекулярно-генетических данных позволит оценить клинические особенности заболевания, оптимизировать тактику лечения и разработать профилактические мероприятия наследственного и sporadического рака молочной железы с учетом индивидуального генотипа с целью снижения заболеваемости и смертности от РМЖ.

Работа частично поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации № 02.512.11.2339

8. Любченко Л.Н., Поспехова Н.И., Портной С.М. и др. Наследственные формы рака молочной железы и/или яичников: прогноз, тактика лечения и профилактика // Материалы VII Российской онкологической конференции. – 2003.
9. Любченко Л.Н., Портной С.М., Поспехова Н.И. и др. Клинико-молекулярные аспекты наследственного рака молочной железы // Молекул. Мед. – 2007. – №1. – С. 8.
10. Любченко Л.Н., Поспехова Н.И., Пароконная А.А. Рак молочной железы и /или яичников в составе наследственного онкологического синдрома //Опухоли женской репродуктивной системы. – 2009. – № 1–2. – С. 59–63.
11. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В. Генетические и клинико-патологические особенности рака молочной железы у больных с сохраненной менструальной функцией и в менопаузе // Успехи геронтологии. – 2000. – Т. 21, № 4. – С. 643–53.
12. Поспехова Н.И., Логинова А.Н., Любченко Л.Н. и др. Молекулярно-генетические аспекты наследственной предрасположенности к раку молочной железы и/или яичников. С чем связана различная локализация рака при мутациях в генах BRCA // Мед генет. – 2005. – 1. – С. 23–7.
13. Тарасов В.А., Асланян М.М., Цырендоржиева Е.С. Популяционно-генетический анализ связи полиморфизмов генов BRCA1 и P53 с развитием спорадического рака молочной железы // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 8. – С. 1115–24.
14. Albano W.A., Recabaren J.A., Lynch H.T. Natural history of hereditary cancer of the breast and colon // Cancer. – 1982. – 50. – P. 360–3.
15. Antoniou A.C., Goldgar D.E., Andrieu N. A weighted cohort approach for analysing factors modifying disease risks in carriers of high-risk susceptibility genes // Genet Epidemiol. – 2005. – 29. – P. 1–11.
16. Auranen A., Spurdle A.B., Chen X. BRCA2 Arg372 His polymorphism and epithelial ovarian cancer risk // Int J Cancer. – 2003. – 103. – P. 427–30.
17. Baudi F., Quaresima B., Grandinetti C. Evidence of founder mutation of BRCA1 in a highly homogeneous population from southern Italy with breast/ovarian cancer // Hum Mutat. – 2001. – 18. – P. 163–4.
18. Baynes C., Healey C.S., Pooley K.A. Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk // Breast Cancer Research. – 2007. – 9. – P. 27.
19. BIC data base online. <http://www.nchgr.nih.gov/bic/>.
20. Bonafé M., Ceccarelli C., Farabegoli F. et al. Retention of the p53 codon 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients // Clin Cancer Res. – 2003. – 15. – P. 4860–4.
21. Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC) 2003. Familial Cancer. – 2003. – 2. – P. 18–32.
22. Brody L.C. Current knowledge on genetic predispositions for breast cancer // The Breast. – 2009. – Suppl. 1. – 18: S4 (Abstr. S9).
23. Bunz F., Hwang P.M., Torrance C. et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents // J. Clin. Invest. – 1999. – 104. – P. 263–9.
24. Buyru N., Altinisik J., Demokan S., Dalay N. p53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer // Cancer Detect Prev. – 2007. – 31. – P. 207–13.
25. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T. et al. Pathologic complete response in young women with BCRA1-positive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy // J Clin Oncol. – 2010. – 28. – P. 375–379.
26. Byrski T., Huzarski T., Dent R. et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BCRA1-positive breast cancer patients // Breast Cancer Res Treat. – 2009. – 115. – P. 359–63.
27. Cavallone L., Arcand S.L., Maugard C. Haplotype analysis of TP53 polymorphism, Arg72Pro and Ins16, in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers of French Canadian descent // BMC Cancer. – 2008. – 10. – P. 96.
28. Campeau P.M., Foulkes W.D., Tischkowitz M.D. Hereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues // Human Genetics. – 2008. – 124. – P. 31–42.
29. Cipollini G., Tommasi S., Paradiso A. Genetic alterations in hereditary breast cancer // Annals of Oncology 15 (Supplement 1): i7–i13, 2004.
30. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease // Lancet. – 2001. – 358. – P. 1389–99.
31. Cooper G. Oncogenes // Jones and Bartlett Publishers. – 1995. – P. 151–2, 175–6.
32. Costa S., Pinto D., Pereira D., Rodrigues H. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer // BMC Cancer. – 2008. – 8. – P. 32.
33. Csokay B., Tihomirova L., Strengrevics A. et al. Strong founder effects in BRCA1 mutation carriers breast cancer patients from Latvia. Mutation in brief no. 258 // Hum Mutat. – 1999. – 14. – P. 92.
34. de la Hoya M., Fernández J.M., Tosar A. Association between BRCA1 mutations and ratio of female to male births in offspring of families with breast cancer, ovarian cancer, or both // JAMA. – 2003. – 290. – P. 929–31.
35. Denisov E.V., Cherdyntseva N.V., Litvyakov N.V. et al. TP53 mutations and Arg72Pro polymorphism in breast cancers // Cancer Genet Cytogenet. – 2009. – 192. – P. 93–5.
36. De Vicchi G., Verderio P., Pizzamiglio S. et al. The p53 Arg72Pro and Ins16bp polymorphisms and their haplotypes are not associated with breast cancer risk in BRCA-mutation negative familial cases // Cancer Detect Prev. – 2008. – 32. – P. 140–3.
37. Drew Y., Calvert H. The potential of PARB inhibitors in genetic breast and ovarian cancer // Ann N Y Acad Sci. – 2008. – 1138. – 136–45.
38. Easton D.F., Pooley K.A., Dunning A.M., Pharoah P.D.P. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci // Nature. – 2007. – 447. – P. 1087–93.
39. Einbeigi Z., Bergman A., Kindblom L.G. et al. A founder mutation of the BRCA1 gene in Western Sweden associated with a high incidence of breast and ovarian cancer // Eur J Cancer. – 2001. – 37. – P. 1904–9.
40. Fackenthal J.D., Marsh D.J., Richardson A.L. et al. Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations // J Med Genet. – 2001. – 38. – P. 159–64.

41. Fackenthal J.D., Olopade O.I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations // *Nat Rev Cancer*. – 2007. – 7. – P. 937–48.
42. Farmer H., McCabe N., Lord C.J. et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy // *Nature*. – 2005. – 434. – P. 917–21.
43. Ford D., Easton D.F., Stratton M. et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families // The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. – 1998. – 62. – P. 676–89.
44. Frank T.S., Deffenbaugh A.M., Reid J.E. et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10 000 individuals // *J Clin Oncol*. – 2003. – 20. – P. 1480–90.
45. Fuks F., Milner J., Kouzarides T. BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF // *Oncogene*. – 1998. – 17. – P. 2531–4.
46. Garcia-Closas M., Egan K.M., Newcomb P.A. et al. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland, meta-analyses // *Hum Genet*. – 2006. – 119. – P. 376–88.
47. Ginhac S.M., Gad S., Corbex M. et al. BRCA1 wild-type allele modifies risk of breast/ ovarian cancer in carriers of BRCA1 germ-line mutations // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2003. – 12. – P. 90–5.
48. Górski B., Byrski T., Huzarski T. et al. Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer // *Am J Hum Genet*. – 2000. – 66. – P. 1963–8.
49. Gronwald J., Tung N., Foulkes W.D. et al. Tamoxifen and contralateral breast cancer in BCRA1 and BCRA2 carriers: an update // *Int J Cancer*. – 2006. – 118. – P. 2281–4.
50. Healey C.S., Dunning A.M., Teare M.D. et al. A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability // *Nat Genet*. – 2000. – 26. – P. 362–4.
51. Hemminki K., Vahtinen P. Familial breast cancer in the family-cancer database // *Int J Cancer*. – 1998. – 77. – P. 386–91.
52. Hughe D., Ginhac S., Coupret A. Common BRCA2 variants and modification of breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. – 2006. – 14(1). – P. 265–7.
53. Huttley G.A., Easton S., Southey M.C. et al. Adaptive evolution of the tumour suppressor BRCA1 in humans and chimpanzees. Australian Breast Cancer Family Study // *Nat Genet*. – 2000. – 25. – P. 410–3.
54. Ishitobi M., Miyoshi Y., Ando A. et al. Association of BRCA2 polymorphism at codon 784 (Met/Val) with breast cancer risk and prognosis // *Clin Cancer Res*. – 2003. – 9. – P. 1376–80.
55. Jernström H., Johannsson O., Borg A. et al. BRCA1-positive patients are small for gestational age compared with their unaffected relatives // *Eur J Cancer*. – 1998. – 34. – P. 368–71.
56. Johnson N., Fletcher O., Palle C. et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility // *Hum. Mol. Genet*. – 2007. – 16. – P. 1051–7.
57. Kadouri L., Hubert A., Rotenberg Y. et al. Cancer risks in carriers of the BRCA1/2 Ashkenazi founder mutations // *Journal of Medical Genetics*. – 2007. – 44. – P. 467–71.
58. Kay C., Jeyendran R.S., Coulam C.B. p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure // *Reprod Biomed Online*. – 2006. – 13. – P. 492–6.
59. Kotar K., Brunet J.S., Møller P. et al. Ratio of female to male offspring of women tested for BRCA1 and BRCA2 mutations // *J Med Genet*. – 2004. – 41. – P. 103.
60. Kyndi M., Alsner J., Hansen L.L. et al. LOH rather than genotypes of TP53 codon 72 is associated with disease-free survival in primary breast cancer // *Acta Oncol*. – 2006. – 45. – P. 602–9.
61. Lakhani S.R., Van De Vijver M.J., Jacquemier J. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2 // *J Clin Oncology*. – 2002. – 20. – P. 2310–8.
62. Lazar V., Hazard F., Bertin F. et al. Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene // *Oncogene*. – 1993. – 8. – P. 1703–5.
63. Li F.P., Fraumeni J.F. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? // *Ann Intern Med*. – 1969. – 71. – P. 747–52.
64. Lindor N.M., Greene M.H. The concise handbook of family cancer syndromes // *Familial Cancer Program. J Natl Cancer Inst*. – 1998. – 90. – P. 1039–71.
65. Lynch H.T., Silva E., Snyder C., Lynch J.F. Hereditary breast cancer: Part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes // *The Breast Journal*. – 2008. – 14. – P. 3–13.
66. Malone K.E., Daling J.R., Thompson J.D. et al. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history // *JAMA*. – 1998. – 279. – P. 922–9.
67. Malone K.E., Daling J.R., Doody D.R. et al. Prevalence and predictors of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of breast cancer in white and black American women ages 35 to 64 year // *Cancer Research*. – 2006. – 66. – P. 8297–308.
68. Marcus J. Hereditary breast cancer: Pathobiology, prognosis, BRCA1 and BRCA2 linkage // *Cancer*. – 1996. – 77. – P. 697–709.
69. Osorio A., Martínez-Delgado B., Pollán M. et al. A haplotype containing the p53 polymorphisms Ins16bp and Arg72Pro modifies cancer risk in BRCA2 mutation carriers // *Hum Mutat*. – 2006. – 27. – P. 242–8.
70. Palli D., Falchetti M., Masala G. et al. Association between the BRCA2 N372H variant and male breast cancer risk: a population-based case-control study in Tuscany, Central Italy // *BMC Cancer*. – 2008. – 7. – P. 170.
71. PDQ® Cancer Information Summary. National Cancer Institute; Bethesda, MD. Genetics of Breast and Ovarian Cancer (PDQ®) – Health Professional. Date last modified 04/24/2009. Available at <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-and-ovarian/healthprofessional>. Accessed 05/15/2009.
72. Peelen T., van Viet M., Petrij-Bosch A. et al. A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families // *Am J Hum Genet*. – 1997. – 60. – P. 1041–9.

73. *Pharoah P.D., Tyrer J., Dunning A.M. et al.* Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk // *PLoS Genet.* – 2007. – 3. – P. 42.
74. *Pisano M., Cossu A., Persico I.* Identification of a founder BRCA2 mutation in Sardinia // *Br J Cancer.* – 2000. – 82. – P. 553–9.
75. *Ponder B.A., Antoniou A., Dunning A. et al.* Polygenic inherited predisposition to breast cancer // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* – 2005. – 70. – P. 35–41.
76. *Rahman N., Scott R.H.* Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players // *Hum Mol Genet.* – 2007. – 1. – P. 60–6.
77. *Risch H.A., McLaughlin J.R., Cole D.E. et al.* Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer // *Am J Hum Genet.* – 2001. – 68. – P. 700–10.
78. *Robson M.* Clinical management of the BRCA heterozygote // *ECCO 10.* – 1999; Vienna, Austria.
79. *Rodier F., Campisi J., Bhaumik D.* Two faces of p53: aging and tumor suppression // *Nucleic Acid Res.* – 2007. – 35 – P. 7475–84.
80. *Rottenberg S., Jaspers J.E., Kersbergen A. et al.* High sensitivity of BRCA 1-deficient mammary tumors to PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drug // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – 105. – P. 17079–84.
81. *Ruijs M.W., Verhoef S., Rookus M.A. et al.* TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes // *J Med Genet.* – 2010. – 47. – P. 421–8.
82. *Sakorafas G.H., Krespis E., Pavlakis G.* Risk estimation for breast cancer development; clinical perspective // *Surg Oncol.* – 2002. – 10. – P. 183–92.
83. *Seal S., Thompson D., Renwick A. et al.* Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles // *Nat Genet.* – 2006. – 38. – P. 1239–41.
84. *Sifri R., Gangadharappa S., Acheson L.S.* Identifying and testing for hereditary susceptibility to common cancers // *Cancer Journal for Clinicians.* – 2004. – 54. – P. 309–26.
85. *Sigurdson A.J., Hauptmann M., Chatterjee N. et al.* Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes // *BMC Cancer.* – 2004. – 4. – P. 9.
86. *Simard J., Tonin P., Durocher F. et al.* Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families // *Nat Genet.* – 1994. – 8. – P. 392–8.
87. *Soukupova J., Dundr P., Kleibl Z. et al.* Contribution of mutations in ATM to breast cancer development in Czech population // *Oncol Rep.* – 2008. – 19. – P. 1505–10.
88. *Soussi T., Beroud C.* Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome // *National Reviews Cancer.* – 2001. – 1. – P. 233–40.
89. *Spurdle A.B., Hopper J.L., Chen X. et al.* The BRCA2 372 HH genotype is associated with risk of breast cancer in Australian women under age 60 years // *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* – 2002. – 11. – P. 413–6.
90. *Struwing J.P., Hartge P., Wacholder S. et al.* The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews // *New England Journal of Medicine.* – 1997. – 336. – P. 1401–8.
91. *Tavtigian S.V., Simard J., Rommens J. et al.* The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds // *Nat Genet.* – 1996. – 12. – P. 333–7.
92. *Teare M.D., Cox A., Shorto J. et al.* Heterozygote excess is repeatedly observed in females at the BRCA2 locus N372H // *J Med Genet.* – 2004. – 41. – P. 523–8.
93. *Thompson D., Easton D.F.* The Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers // *Journal of the National Cancer Institute.* – 2002. – 94. – P. 1358–65.
94. *Thull D.L., Vogel V.G.* Recognition and management of hereditary breast cancer Syndromes // *The Oncologist.* – 2004. – 9. – P. 13–24.
95. *Tommiska J., Eerola H., Heinonen M. et al.* Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival // *Clin Cancer Res.* – 2005. – 11. – P. 5098–103.
96. *Turnbull C., Ahmed S., Morrison J. et al.* Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci // *Nat Genet.* – 2010. – 42. – P. 504–7.
97. *Veronesi U., Maisonneuve P., Costa A. et al.* Prevention of breast cancer with tamoxifen: Preliminary findings from the Italian randomized trial among hysterectomized women // *Lancet.* – 1998. – 352. – P. 93–7.
98. *Walsh T., Casadei S., Coats K.H. et al.* Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer // *JAMA.* – 2006. – 295. – P. 1379–88.
99. *Wang-Gohrke S., Becher H., Kreienberg R. et al.* Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years // *Pharmacogenetics.* – 2002. – 12. – P. 269–72.
100. *Weischer M., Bojesen S.E., Tybjaerg-Hansen A. et al.* Increased risk of breast cancer associated with CHEK2*1100delC // *J Clin Oncol.* – 2008. – 26. – P. 3092–4.
101. *Wenham R.M., Schildkraut J.M., McLean K. et al.* Polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and risk of epithelial ovarian cancer // *Clin Cancer Res.* – 2003. – 9. – P. 4396–403.
102. *Zhoucun A., Zhang S., Yang Y. et al.* The common variant N372H in BRCA2 gene may be associated with idiopathic male infertility with azoospermia or severe oligozoospermia // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2006. – 124. – P. 61–4.
103. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1>
104. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA2>
105. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>

УДК 618.146-006.6:577.21.088

*Л.И. Короленкова, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников***МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АДГЕЗИИ, УТРАТЫ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ СВЯЗЕЙ, ИНВАЗИИ И НЕОАНГИОГЕНЕЗА КАК ФАКТОРЫ ПРОГРЕССИИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И РШМ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Короленкова Любовь Ивановна, старший научный сотрудник поликлиники НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-44-06;**e-mail:** l.korolenkova@mail.ru

Статья поступила: 16.01.2011, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

В процессе канцерогенеза рака шейки матки по мере усугубления тяжести цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN) растёт способность клеток к инвазии, уменьшается прочность межклеточных контактов, а увеличивающаяся масса неоплазированных тканей нуждается в обеспечении новой сосудистой сетью. Обзорная статья посвящена анализу данных литературы об экспрессии различных маркеров инвазии (матриксных металлопротеиназ MMP1,2,9; TIMP1), состояния белков базальной мембраны и внеклеточного матрикса (ламини-5, коллагена IV типа), межклеточных связей и молекул адгезии (Е-кадгерина, бета-катенина, EP-CAM, CD44), а также неангиогенеза (VEGF, VEGF-R2, bFGF, тимидин фосфорилазы) по мере прогрессирования CIN до инвазивного рака. Сделан акцент на возможности использования ряда устойчиво экспрессируемых веществ в качестве маркеров скрытой или близкой инвазии и прогноза исхода CIN.

Ключевые слова: цервикальные интраэпителиальные неоплазии, маркеры прогрессии CIN, рак шейки матки, маркеры неангиогенеза и инвазии.

*L.I. Korolenkova, E.V. Stepanova, A.Yu. Baryshnikov***MOLECULAR BIOMARKERS OF DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA. MARKERS OF ADHESION, LOSS OF INTERCELLULAR CONNECTIONS, INVASION AND NEOANGIOGENESIS***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

As the cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progresses from low-grade to high-grade lesion the density of intercellular contacts decreases, cells invasive potential gradually raises, and the growing tissue mass requires new vascular network. This review presents the analysis of literature data on expression of various markers of invasion (matrix metalloproteinases MMPs 1; 2; 9; TIMP1), of basal membrane and extracellular matrix condition (laminin-5, collagen IV), intercellular connections and adhesion (E-cadherine, beta-catenin, EP-CAM, CD44), of neoangiogenesis (VEGF, VEGF-R2, bFGF, thymidine phosphorylase). The possibility of using some distinctly expressed substances as markers of latent or close invasion of CIN is pointed out.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, markers of CIN progression, cervical cancer, markers of neoangiogenesis and invasion

Введение

Формирование тяжелых цервикальных интраэпителиальных неоплазий, к которым относятся CIN 2-3 – умеренные, тяжелые дисплазии и карцинома *in situ* (CIS) – сопровождается ростом массы неоплазированных клеток, нуждающихся в образовании новой сосудистой сети – неангиогенезе. В эпителиальных слоях, состоящих из иммортализованных пролиферирующих клеток, не прошедших стадию первичной дифференцировки, нарушаются межклеточные связи, что, в конечном итоге, приводит к инвазии и метастазированию. Процесс инвазии сопровождается выработкой протеиназ, разрушающих компоненты базальной мембраны и внеклеточного матрикса. Появляется способность к миграции в подлежащую строму путем адгезии к белкам внеклеточного матрикса. Определение маркеров, отражающих состояние компонентов базальной мембраны, способность клеток к адгезии и образованию межклеточных связей, выработку клетками протеиназ, факторов роста сосудов и их

рецепторов, может помочь в диагностике грядущей или настоящей скрытой инвазии.

Молекулярно-биологические маркеры прогрессии CIN до инвазивного рака

Выбор объема хирургического вмешательства и прогноз при эпителиальных поражениях шейки матки зависит от наличия или отсутствия инвазии неоплазированных клеток в подлежащие ткани. Присутствие инвазии обнаружить достаточно сложно, особенно если для оценки доступен только биопсийный материал. В большинстве случаев микрокарцинома не диагностируется в биоптатах и обнаруживается лишь при морфологическом исследовании удаленной (конизация или ампутация) шейки матки. При микроинвазивном раке чаще всего участки инвазивного роста расположены на фоне CIN 3 с вовлечением множества крипт, полная оценка состояния базальной мембраны которых затруднена. Инвазия иногда может присутствовать на ограниченных участках в виде размытости базальной мембраны и не попадать ни в один из срезов конуса, что затрудняет ее диагностику.

Нередки случаи неверной трактовки как преинвазивного рака истинно инвазивного процесса [5]. Именно поэтому приоритетной задачей является повышение чувствительности и объективности диагностических процедур для выявления инвазивного потенциала неопластических клеток.

Способность к инвазии определяется, прежде всего, возможностью клеток проникать через подлежащую БМ и затем мигрировать в окружающую строму путем адгезии к ВКМ. При CIN 1–3 базальная мембрана еще не повреждена и отделяет пролиферирующие эпителиальные клетки от подлежащей соединительнотканной стромы. Трансформация неинвазивных интраэпителиальных неоплазий в инвазивную карциному шейки матки сопровождается локальной деструкцией и разрывом БМ. Очевидный инвазивный рост требует продукции протеиназ, специфически разрушающих белки БМ и ВКМ. Изменение уровня и соотношения таких протеиназ может коррелировать с наличием морфологической инвазии и предсказывать инвазивный потенциал опухоли.

Матриксные металлопротеиназы (ММР) и катепсины играют главную роль в процессах опухолеиндуцированного ангиогенеза, клеточной миграции, пролиферации, апоптоза и деградации соединительной ткани, а также инвазии и метастазирования. ММР принадлежат к семейству цинк-кальций-зависимых протеиназ и способны разлагать компоненты внеклеточного матрикса, включая коллаген, желатин, фибронектин, ламинин и протеогликан. Описано около 20 человеческих ММР, включая коллагеназы, разрушающие волокна нативного коллагена I–III типов, и стромелизины 1 и 2, воздействующие на широкий спектр субстратов. Наиболее изучена экспрессия желатиназ А и В, ММР-1; 2; 9; 11 и 12, денатурирующих коллаген и другие основные компоненты базальной мембраны [9; 11; 21; 22; 26; 35; 38]. Антагонистами ММР служат тканевые ингибиторы металлопротеиназ (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP), экспрессия которых сдерживает рост многих опухолей [12; 39]. Эпителий и строма нормальной ткани шейки матки не окрашиваются антителами к ММР-1 и ММР-2 [9; 11]. Слабое окрашивание на ММР-2 характерно только для небольшого количества эпителиальных клеток базального слоя. Некоторые исследователи отметили слабую экспрессию ММР в неоплазированном эпителии [12], другие наблюдали увеличение экспрессии ММР-2 в поврежденном эпителии: при CIN 2 и 3 соответственно в 38 и 80 % анализированных материалов, тогда как в прилежащих областях экспрессия отсутствовала или была выражена слабо и связана с воспалительной реакцией [9]. Локальная экспрессия ММР-2 при CIN 2-3/CIS может быть индикатором областей с повышенным риском инвазивного роста. При раке коэкспрессия ММР-1 и ММР-2 ассоциируется с последовательно увеличивающимся инвазивным потенциалом опухолевых клеток. Как ММР-2, так и TIMP-2 играют ключевую роль в инвазии неоплазированных клеток в экстрацеллюлярный матрикс [12]. ММР-1 является ключевым ферментом, опосредующим прогрессию РШМ [38]. Гиперэкспрессия ММР при CIN 2-3 может быть маркером близости инвазии или скрытой инвазии даже без морфологически доказанного инвазивного роста [22]. Повышение экспрессии ММР-9 находят как при CIN 2, так и при CIN 3 и инвазивных карциномах, что позволяет рассматривать ее как возможный маркер близкой опухолевой прогрессии [12]. Цитоплазматическая экспрессия ММР-9 обнаружена в 85 % CIN 1, 73 % CIN 2 и 79 % CIN 3 [31]. Не обнаружено корреляции между экспрессией ММР-9 и наличием ВПЧ-инфекции.

Неопластические клетки мигрируют из первичного очага путем адгезии к белкам ВКМ, таким как ламинины, коллагены и фибронектины. Ламинины являются семейством экстрацеллюлярных белков, основным компонентом БМ. В нормальных эпителиальных клетках синтез ламинина-5 ассоциирован с регенерацией ткани.

Сильная экспрессия ламинина-5 наблюдается в мигрирующих кератиноцитах при заживлении раны [28]. Недавние исследования показали, что экспрессия ламинина-5 в эпителиальных клетках может быть использована в качестве чувствительного маркера инвазивного потенциала поражений шейки матки [21; 23; 33; 36]. В норме и при легких повреждениях экспрессия ламинина-5 отсутствует или ограничена только базальной мембраной.

При этом его экспрессия наблюдается во всех случаях инвазивного и микроинвазивного рака, локализуясь преимущественно по линии инвазии и в участках микроинвазии на фоне CIN 3. В то же время в образцах CIN 3 без инвазии экспрессия отмечена только в 34–37 % случаев. То есть, экспрессия ламинина-5 ассоциирована с поздними этапами канцерогенеза и может служить для идентификации микроинвазии на фоне CIN 3, а также выявления случаев с высоким риском близкой прогрессии [21; 23; 24].

В базальной мембране содержание ламинин-5-γ-2 цепей уменьшается с 78,4 % в нормальном эпителии до 27,8 % при CIN 3. Цитоплазматическое же окрашивание, наоборот, возрастает по мере увеличения тяжести повреждения.

Также отмечено, что сочетание отсутствия экспрессии ламинин-5-γ-2 цепей в базальной мембране при экспрессии p16INK4a и PCNA ассоциировано с быстрым началом клинической прогрессии CIN. Обратное же сочетание ламинин-5-γ-2+ при p16INK4a- и PCNA- свидетельствует об увеличении времени выхода в прогрессию от 46,8±36,3 до 110,2±52,7 мес [36].

Сочетание данных маркеров целесообразно использовать для предсказания прогрессии CIN. Отмечено также связанное изменение экспрессии γ-2 цепей ламинина-5 и ММР-2, так как последняя за счет отщепления γ-2 субъединицы переводит ламинин-5 из статичной формы в мигрирующую. В норме локализованное только в базальной мембране при CIN 3 окрашивание на γ-2 цепи ламинина-5 и ММР-2 смещается в сторону стромы, становясь еще более выраженным при инвазии с наибольшей экспрессией по ходу инвазивного «фронта» [21]. Основным компонентом базальной мембраны является коллаген IV типа, разрушение которого неизбежно в процессе инвазии. Интенсивность окрашивания базальной мембраны на коллаген IV уменьшается при увеличении тяжести повреждений, при инвазивном раке базальная мембрана в абсолютном большинстве случаев не окрашивается вообще [11; 29]. Инструментом для оценки состояния базальной мембраны при подозрении на инвазию может быть двойное иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание на цитокератин + коллаген IV и цитокератин-ламинин [29]. Оно целесообразно в сомнительных случаях, например при выраженном воспалении или на тангенциальных срезах, когда определить состояние мембраны крайне затруднительно или невозможно. По мере увеличения тяжести повреждения также растет экспрессия рецепторов 67-kd к ламинину, особенно выражено увеличение ее при переходе от CIN 2 к CIN 3 и далее к инвазивному раку [7]. По-видимому, гиперэкспрессия рецепторов к ламинину при тяжелых CIN отражает клеточную пролиферацию.

Еще одним перспективным маркером прогрессии CIN и инвазии может оказаться Е-кадгерин, обеспечивающий нормальную адгезию эпителиальных клеток, а также подавляющий способность опухолей к инвазии. Известно, что он может изменять инвазивный фенотип кератиноцитов клеточных линий, трансформированных ВПЧ-инфекцией. Ряд авторов обнаружили снижение выработки Е-кадгерина по мере увеличения тяжести CIN, особенно заметное при переходе к CIN 3 и инвазивному раку [3; 4; 8; 14; 20]. Анализируя ИГХ экспрессию Е-кадгерина, отмечают высокую специфичность 90,9 % и прогностическую ценность снижения экспрессии Е-кадгерина (97,4 %) для определения CIN, однако она не является очевидным прогностическим фактором инвазии [8]. Экспрессия Е-кадгерина, определяемая как в гистологических, так и в цитологических препаратах, может быть использована в дополнение к цитологическому, гистологическому и кольпоскопическому исследованиям для выявления CIN тяжелой степени с худшим прогнозом.

Изучалась также экспрессия β -катенина и EPCAM при CIN и инвазивном раке. Показано, что гиперэкспрессия EPCAM и частота нарушений экспрессии β -катенина нарастают по мере усугубления тяжести повреждений, резкий скачок частоты гиперэкспрессии EPCAM наблюдается при переходе к CIN 3 [37]. CD44 – трансмембранный гликопротеид, обеспечивающий межклеточные и клеточно-матриксные связи. Одна из изоформ CD44 – CD44v6 по некоторым данным изменяет метастатический потенциал опухолевых клеток и обеспечивает проникновение их в строму при развитии РШМ [6]. При переходе от легких CIN к тяжелым и инвазивному раку обнаружены количественные изменения экспрессии CD44, CD44v6 и Е-кадгерина, а также изменение распределения этих белков в клетке: уменьшение экспрессии в клеточной мембране при увеличении в цитоплазме. Авторы связывают это с утратой дифференцировки кератиноцитов в ходе неопластической трансформации [14]. Также отмечено повышение экспрессии TIMP1, интегринов α 1 и 4, кадхеринов 2 и 11, катепсинов F, B, L2, MMP 9; 10; 11 и 12 и понижение экспрессии катепсинов S, L, H и C, кадхеринов 3 и 4, TIMP3, MMP 13, эластазы 2 и интегрин β 8, причем гиперэкспрессия катепсина F и MMP-11 и 12 при инвазивном росте была наиболее значительной [35]. Трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor- β , TGF- β) принимает участие в иммуносупрессии, образовании стромы и экстрацеллюлярного матрикса и контролирует рост эпителиальных клеток. Экспрессия мРНК рецепторов TGF- β TGFBR1 коррелирует с увеличением тяжести CIN [30].

Молекулярно-биологические маркеры гипоксии и неоангиогенеза

Неоангиогенез, формирование сети капилляров из эндотелиальных клеток, выступающих мелкие вены, является необходимым условием для дальнейшего роста опухоли диаметром 1–2 мм. Для процесса ангиогенеза характерно равновесие между стимулирующими и подавляющими рост сосудов факторами. Проангиогенные вещества могут выделять клетки опухоли, стромальные клетки, клетки воспаления, внеклеточного матрикса и собственно эндотелиальные клетки [16]. Более того, эти факторы могут участвовать в морфогенезе капилляров и регулировать выделение протеолитических ферментов. Гипоксические опухоли считают более агрессивными и склонными к метастазированию, что определяет не-

благоприятный прогноз. По этой причине выявление маркеров гипоксии может быть важно для прогноза течения CIN и ранних форм РШМ. Индуцируемый гипоксией фактор (hypoxia-inducible factor, HIF) выделяется в ответ на гипоксию в большинстве клеток и активирует транскрипцию множества генов, связанных с доставкой кислорода и обеспечивающих метаболическую адаптацию опухолевой клетки (гликолитические ферменты, переносчики глюкозы), а также неоангиогенез.

Описанная выше MMP-9 и фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) – два наиболее значимых фактора неоангиогенеза [26; 27]. VEGF является важным полифункциональным цитокином, индуцирующим физиологический и опухолевый неоангиогенез. Увеличение синтеза VEGF наблюдается как при CIN, так и в инвазивных карциномах [1; 17; 25].

Оно ассоциировано с увеличением количества микрососудов [32]. Показано, что синтез VEGF (по количеству мРНК) увеличивается параллельно степени эпителиальных повреждений и растущей массы опухоли, тогда как в нормальном эпителии синтез VEGF значительно ниже [18; 19; 30]. VEGF-C является маркером цервикального канцерогенеза с линейно повышающейся экспрессией от начальной стадии CIN к CIN3 и инвазивному раку и выраженным увеличением экспрессии при переходе от преинвазивного рака к инвазивному [10; 16; 19; 30]. Было отмечено повышение экспрессии VEGF лимфоцитами CD3 и моноцитами-макрофагами, а также увеличение концентрации супероксид аниона в клетках CIN 2 и 3, что свидетельствует о кислородном стрессе в эпителиальном пласте CIN [10]. Показано, что экспрессия VEGF увеличивается не только в эпителиальных клетках, но даже интенсивнее происходит в окружающей строме [18]. Исследователи полагают, что уровень VEGF в ткани может быть индикатором степени злокачественной трансформации эпителия шейки матки [17; 30; 31]. Экспрессия рецептора VEGF-R2 также повышается с увеличением тяжести неоплазии [19].

Информация о значениях для неоангиогенеза фактора роста фибробластов bFGF весьма ограничена. Показано, что в нормальном эпителии и при низкой степени CIN уровень синтеза данного цитокина одинаков [15; 30; 34]. При инвазивном раке синтез bFGF несколько увеличивается [15]. Полагают, что bFGF не является важным стимулятором цервикального ангиогенеза [30].

Тимидин фосфорилаза (ТФ) представляет собой ангиогенный фермент, гиперэкспрессию которого находят в большом числе солидных опухолей. ТФ в отличие от VEGF и bTGF не является митогеном для эндотелиальных клеток и не связывает гепарин. Механизм действия ТФ как ангиогенного стимулятора изучен пока недостаточно. Важно, что ТФ локализуется внутри клеток, тогда как основное ее действие, в конечном итоге, внеклеточное – на близлежащие микрокапилляры.

Показано, что цитоплазматическая и ядерная экспрессия ТФ встречается в базальном слое нормального эпителия шейки матки. В образцах CIN 3 при ИГХ обнаружено повышение уровня экспрессии и количества положительных клеток, достоверно различающееся с таковыми в нормальном эпителии [2]. По мере увеличения степени неоплазии уровень экспрессии ТФ растет [13].

Однако целесообразность использования ТФ в качестве маркера при разработке методов химиопрофилактики или лечения РШМ в настоящее время не доказана.

Заключение

Таким образом, развитие интраэпителиальных неоплазий шейки матки и их прогрессия до рака является комплексным процессом, в котором принимают участие многочисленные молекулярно-биологические маркеры, контролирующие процессы пролиферации, апоптоза, инвазии, ангиогенеза и другие. Следует особенно отметить, что экспрессия многих маркеров существенно меняется при перехо-

де от CIN 2 к CIN 3 и далее к инвазивному раку, что отражает радикальное отличие клинико-морфологических характеристики легких и тяжелых повреждений. Только комплексное изучение экспрессии молекулярно-биологических маркеров может дать полную информацию для постановки диагноза, прогнозирования течения и лечения предраковых и раковых повреждений шейки матки, а также оценить их перспективность в разработке химиотерапевтической профилактики и лечения РШМ.

Литература

1. Козаченко А.В. Микрокарцинома шейки матки: клиника, диагностика, лечение. – Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2006. – 45 с.
2. Подистов Ю.И. Эпителиальные дисплазии шейки матки (диагностика, лечение). – Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2005. – 63 с.
3. Снугур Н.В., Анурова О.А. Особенности экспрессии Ki-67, сурвивина и Е-кадхерина в интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки // XII Российская онкологическая конференция 17–19 ноября 2009г. – Москва, 2009.
4. Снугур Н.В. Интраэпителиальные неоплазии и микроинвазивный рак шейки матки. Клинические и молекулярно-биологические особенности. – Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2009. – 26 с.
5. Al-Nafussi A.I., Monaghan H. Squamous carcinoma of the uterine cervix with CIN3-like growth pattern: an under-diagnosed lesion // Int J Gynecol Cancer. – 2000. – 10. – P. 95–9.
6. Bouda J., Boudova L., Hes O. et al. CD44v6 as a prognostic factor in cervical carcinoma FIGO stage IB // Anticancer Research. – 2005. – 25. – P. 617–22.
7. Branca M., Giorgi C., Ciotti M. et al. Relationship of up-regulation of 67-kd laminin receptor to grade of cervical intraepithelial neoplasia and to high-risk HPV types and prognosis in cervical cancer // Acta Cytol. – 2006. – 50(1). – P. 6–15.
8. Branca M., Giorgi C., Ciotti M. et al. Down-regulation of E-cadherin is closely associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but not with high-risk human papillomavirus (HPV) or disease outcome in cervical cancer // Eur J Gynaecol Oncol. – 2006. – 27(3). – P. 215–23.
9. Brummer O., Böhmer G., Hollwitz B. et al. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation—an immunohistochemical study // Gynecol Oncol. – 2002. – 84(2). – P. 222–7.
10. Carrero Y., Callejas D., Alaña F. et al. Increased vascular endothelial growth factor expression, CD3-positive cell infiltration, and oxidative stress in premalignant lesions of the cervix // Cancer. – 2009. – 115(16). – P. 3680–8.
11. Davidson B., Goldberg I., Gotlieb W.H. et al. Expression of matrix proteins in uterine cervical neoplasia using immunohistochemistry // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 1998. – 76(1). – P. 109–14.
12. Davidson B., Goldberg I., Kopolovic J. et al. MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma—a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization // Gynecologic Oncology. – 1999. – 73(3). – P. 372–82.
13. Dobbs S.P., Brown L.J., Ireland D. et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor expression and angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix // Ann Diagn Pathol. – 2000. – 4(5). – P. 286–92.
14. Faleiro-Rodrigues C., Lopes C. E-cadherin, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical study // Pathobiology. – 2004. – 71(6). – P. 329–36.
15. Fujimoto J., Ichigo S., Hori M. et al. Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in advanced uterine cervical cancers // Cancer Lett. – 1997. – 111(1–2). – P. 21–6.
16. Goh P.P., Sze D.M., Roufogalis B.D. Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis // Current Cancer Drug Targets. – 2007. – 7(8). – P. 743–58.
17. Guidi A.J., Abu-Jawdeh G., Berse B. et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia // J Natl Cancer Inst. – 1995. – 87(16). – P. 1237–45.
18. Hammes L.S., Tekmal R.R., Naud P. et al. Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor (CIN) lesions and invasive disease // Gynecol Oncol. – 2008. – 110(3). – P. 445–51.
19. Jach R., Dulinska-Litewka J., Laidler P. et al. Expression of VEGF, VEGF-C and VEGFR-2 in in situ and invasive SCC of cervix // Front Biosci (Elite Ed). – 2010. – 2. – P. 411–23.
20. Kaplanis K., Kiziridou A., Liberis V. et al. E-cadherin expression during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix // European Journal of Gynaecologic Oncology. – 2005. – 26(6). – P. 608–10.
21. Malina R., Motoyama S., Hamana S., Maruo T. Laminin-5 gamma2 chain and matrix metalloproteinase-2 expression in the neoplastic changes of uterine cervical squamous epithelium // Kobe J Med Sci. – 2004. – 50(3–4). – P. 123–30.
22. Minami R., Tsunoda H., Iijima T. et al. Early acquisition of gelatinolytic activity in carcinogenesis of the uterine cervix // Mod Pathol. – 2003. – 16(11). – P. 1164–70.
23. Noel J.C., Fernandez-Aguilar S., Fayt I. et al. Laminin-5 gamma 2 chain expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma // Acta Obstet Gynecol Scand. – 2005. – 84(11). – P. 1119–23.
24. Nordemar S., Kronenwett U., Auer G. et al. Laminin-5 as a predictor of invasiveness in cancer in situ lesions of the larynx // Anticancer Res. – 2001. – 21(1B). – P. 509–12.

25. Obermair A., Bancher-Todesca D., Bilgi S. et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia // J Natl Cancer Inst. – 1997. – 89(16). – P. 1212–7.
26. Polette M., Nawrocki-Raby B., Gilles C. et al. Tumour invasion and matrix metalloproteinases // Crit Rev Oncol Hematol. – 2004. – 49. – P. 179–86.
27. Raza S.L., Cornelius L.A. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities // J Investig Dermatol Symp Proc. – 2000. – 5. – P. 47–54.
28. Ryan M.C., Tizard R., VanDevanter D.R., Carter W.G. Cloning of the LamA3 gene encoding the alpha 3 chain of the adhesive ligand epiligrin. Expression in wound repair // J Biol Chem. – 1994. – 269(36). – P. 22779–87.
29. Rush D., Hyjek E., Baergen R.N. et al. Detection of microinvasion in vulvar and cervical intraepithelial neoplasia using double immunostaining for cytokeratin and basement membrane components // Arch Pathol Lab Med. – 2005. – 129(6). – P. 747–53.
30. Soufla G., Sifakis S., Baritaki S. et al. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix // Cancer Lett. – 2005. – 221(1). – P. 105–18.
31. Talvensaari-Mattila A., Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase 9 in the uterine cervix during tumor progression // Int J Gynaecol Obstet. – 2006. – 92(1). – P. 83–4.
32. Tjalma W., Weyler J., Weyn B. et al. The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 2000. – 92(2). – P. 251–7.
33. Tringler B., Grimm C., Dudek G. et al. The lack of laminin-5 as a prognostic marker in low-grade cervical squamous intraepithelial lesions: correlation with clinical follow-up data // Int J Gynecol Pathol. – 2007. – 26(1). – P. 89–94.
34. Van Trappen P.O., Ryan A., Carroll M. et al. A model for co-expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer // Br J Cancer. – 2002. – 87(5). – P. 537–44.
35. Vazquez-Ortiz G., Pina-Sanchez P., Vazquez K. et al. Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer // BMC Cancer. – 2005. – 5(1). – P. 68.
36. Wang J.L., Andersson S., Li X. et al. p16INK4a and laminin-5gamma2 chain expression during the progression of cervical neoplasia // Acta Oncol. – 2006. – 45(6). – P. 676–84.
37. Yang J.Z., Zhang X.H., Wu W.X. Expression of EP-CAM, beta-catenin in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of uterine cervix // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2003. – 25(4). – P. 372–5.
38. Zhai Y., Hotary K.B., Nan B. et al. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion // Cancer Research. – 2005. – 65(15). – P. 6543–50.
39. Zhang, Y., Qian H., Lin C. et al. Adenovirus carrying TIMP-3: a potential tool for cervical cancer treatment // Gynecologic Oncology. – 2008. – 108(1). – P. 234–40.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



Издание 2-е, переработанное и дополненное

**ЭНЦИКЛОПЕДИЯ
КЛИНИЧЕСКОЙ
ОНКОЛОГИИ**

**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**

УДК 616.155.394.5:576.353.4

*К.А. Скрыпник, В.С. Косоруков***ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ГРАНУЛОЦИТАРНЫЙ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР
В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Скрыпник Ксения Александровна, научный сотрудник лаборатории трансгенных препаратов НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-14-59;**e-mail:** kssa@yandex.ru

Статья поступила: 16.01.2011, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор – один из основных препаратов, используемых в онкологической практике для лечения нейтропении. Исследования последних лет дают основания предполагать, что область клинического применения этого цитокина может быть значительно расширена. Обнаруженные у чГ-КСФ иммунорегуляторные и нейропротекторные свойства позволят применять этот препарат не только для лечения гематопозитических заболеваний, но и для борьбы с инсультом, аутоиммунными болезнями и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Ключевые слова: гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, цитокин, нейтропения.*K.A. Skrypnik, V.S. Kosorukov***HUMAN GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR AS
A NEW THERAPEUTIC AGENT IN CLINIC***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) is the principal cytokine controlling neutrophil function and developing. At present, hG-CSF is widely used in adjuvant cancer therapy. It's administration during neutropenia allows to increase neutrophil count and to avoid infections developing in cancer patients. Several recent studies described some new activities of hG-CSF in stroke, acute myocardial infarction and autoimmune diseases. Further studies of these new activities are needed to use this therapeutic agent in clinic.

Key words: g-csf, cytokine, neutropenia.**Введение**

чГ-КСФ – один из гемопоэтических факторов, играющих важную роль в организме. Этот цитокин способствует выживанию клеток-предшественников нейтрофильных гранулоцитов, стимулирует их деление, последующую дифференцировку и созревание, необходим он и для активации зрелых нейтрофилов [24].

чГ-КСФ способен не только увеличивать количество нейтрофилов в периферической крови, но и усилить их противомикробные свойства – хемотаксис и фагоцитоз [1].

Обладая таким спектром активностей, чГ-КСФ широко применяется в онкологической практике для лечения нейтропении, вызванной химио- и радиотерапией.

Уменьшение количества нейтрофилов приводит к резкому снижению иммунитета и способности сопротивляться внешним инфекциям. Введение препарата, содержащего чГ-КСФ, позволяет восстановить уровень нейтрофилов, повысить иммунитет и избежать возникновения сопряженных инфекций.

Строение чГ-КСФ и его рецептора

Колониестимулирующие факторы были обнаружены в 1960-х гг. Было показано, что выживаемость, пролиферация, дифференцировка незрелых гематопозитических клеток зависит от присутствия неких факторов, объединенных названием «факторы с

колониестимулирующим действием». В то время не было ясно: является ли для дифференцировки ключевым какой-то отдельный белок или важным оказывается присутствие всего комплекса факторов? Очистка каждого из факторов, последующее клонирование и исследование сделало возможным определить биологическую роль каждого из компонентов [9; 25].

Первоначально чГ-КСФ был назван гранулоцитарно-макрофагальным фактором дифференцировки (ГМФД), однако в дальнейшем было показано, что этот белок отличается от гранулоцитарно-макрофагального фактора (ГМ-КСФ) выделенного ранее. Выделенный цитокин получил название гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, так как стимулировал формирование колоний гранулоцитов из клеток-предшественников.

Г-КСФ обнаружен у многих млекопитающих – человека, мыши, свиньи, крысы, кошки, овцы, лошади. Последовательности исследованных цитокинов показали высокий уровень сходства (65–90 %).

Г-КСФ экспрессируется в основном моноцитами и макрофагами, а также астроцитами, эндотелиальными клетками, фибробластами. Результатом экспрессии Г-КСФ является 174 аминокислотный гликопротеид массой 19,6 кДа. Белок представляет собой 4 антипараллельных левозакрученных α -спирали [11]. чГ-КСФ гликозилирован по Thr 133, что снижает агрегацию молекул, но не оказывает непосредственного влияния на биологическую активность и способность связываться с рецептором.

Рецептор χ Г-КСФ (χ Г-КСФ-Р) – мембранный белок, относящийся к суперсемейству цитокиновых рецепторов. Этот полипептид кодируется геном, расположенным на первой хромосоме [6]. χ Г-КСФ-Р экспрессируется на поверхности практически всех клеток миелоидного ряда как миелобластов, так и дифференцированных нейтрофилов. Экспрессия обнаружена также в моноцитах, лимфоидных клетках, тромбоцитах, клетках эндотелия сосудов, плацентарных клетках и, возможно, в нейронах и глиальных клетках [13; 28; 34].

Молекула рецептора состоит из внеклеточного, трансмембранного и цитоплазматического доменов [3]. Внеклеточная часть молекулы содержит Ig-подобный домен, три фибронектин III-подобных домена и область, специфичную для цитокиновых рецепторов [33]. Внеклеточный домен обеспечивает связывание рецептора с лигандом. Строение цитоплазматического домена менее консервативно, он участвует в передаче сигнала, возникающего в результате связывания рецептора с χ Г-КСФ.

Показано, что молекула χ Г-КСФ имеет два различных рецептор-связывающих сайта, также два сайта посадки лиганда несет и рецептор χ Г-КСФ [17]. Первоначальное связывание происходит при взаимодействии Glu-19 цитокина и Arg-288 рецептора. Это связывание вызывает конформационные изменения в структуре обоих белков, что делает возможным взаимодействие иммуноглобулинового домена другой молекулы рецептора с молекулой χ Г-КСФ. Результатом взаимодействия является димеризация рецептора и формирование 2:2 (χ Г-КСФ : χ Г-КСФ-Р) комплекса.

Связывание χ Г-КСФ со своим рецептором приводит к активации нескольких сигнальных путей: Jak-STAT, Raf-MAP и PI-3, стимулируя пролиферацию и созревание нейтрофилов.

Рекомбинантные аналоги χ Г-КСФ и их применение в клинической практике

Уже более 20 лет χ Г-КСФ применяется в гематологической и онкологической практике для лечения или облегчения состояния пациентов с различными нарушениями. В настоящее время создан ряд модифицированных рекомбинантных аналогов, которые используются в клинике.

Для получения рекомбинантных белков применяют различные подходы. Экспрессировать целевой белок можно в эукариотических и прокариотических системах. Например, в клетках культур клеток млекопитающих получают гликозилированную форму χ Г-КСФ – коммерческий аналог ГраноцитTM (ленограстим). Широко используются и бактериальные системы экспрессии, позволяющие достигать высокого уровня продукции целевого белка, что, наряду с простотой культивирования, является несомненным преимуществом данного типа продуцентов. Однако при бактериальной экспрессии отсутствуют посттрансляционные модификации, например, гликозилирование. Для ряда эукариотических белков отсутствие таких модификаций не является критичным при проявлении их биологической активности. Отметим, что гликозилирование не оказывает влияния и на биологическую активность Г-КСФ, в клинической практике сейчас используются как негликозилированные, так и гликозилированные аналоги [12].

Наиболее активно применяется рекомбинантный χ Г-КСФ, поставляемый в продажу фирмой Amgen под международным названием филграстим (коммерческое название НейпогенTM). Это негликозилированный аналог χ Г-КСФ, выделенный из *E.*

coli. Белок состоит из 175 аминокислотных остатков, и имеет молекулярный вес 18 800 Да. Количество аминокислотных остатков больше, чем в аутентичном белке, за счет присутствия N-концевого метионинового остатка. Период полужизни препарата составляет около 3,5 ч., соответственно, для достижения терапевтического эффекта – повышения и поддержания должного уровня нейтрофилов – необходимы частые инъекции филграстима.

Этой же фирмой в 2002 г. был разработан ПЭГ-филграстим – модифицированный аналог Нейпогена [36]. Особенность данного препарата – молекула χ Г-КСФ через N-концевой лизин ковалентно связана с полиэтиленгликолем. Присоединение полимера приводит к повышению стабильности препарата, увеличению продолжительности действия введенной дозы. Были проведены исследования по сравнению действия филграстима и пэгфилграстима на мышей и здоровых пациентов. Показано, что введение единичной дозы ПЭГфилграстима через сутки после курса миелосупрессивной терапии приводит к увеличению количества нейтрофилов, в то время как для филграстима сходный эффект достигается при ежедневном введении (в среднем 11 ежедневных инъекций) [23]. Препарат представлен на рынке под названием НелустаTM. Еще одним негликозилированным аналогом χ Г-КСФ является нартограстим, полученный и применяемый в Японии. В N-концевой области нартограстима для достижения высокого уровня экспрессии в бактериальных системах заменено несколько аминокислот [21]. По сравнению с филграстимом нартограстим обладает повышенной стабильностью. Как и филграстим, он влияет на дифференцировку, созревание нейтрофилов, ускоряет их перемещение из костного мозга в периферическую кровь.

В сравнительных исследованиях филграстима, ленограстима и нартограстима не было получено значимых различий. Все три препарата обладают сходными фармакокинетическими и фармакологическими эффектами, повышая уровень нейтрофилов. Можно предположить, что ни гликозилирование, ни изменение N-концевых аминокислот Г-КСФ не оказывает значительного влияния на действие на нейтрофилы *in vivo* [32]. В сравнении с негликозилированным филграстимом требуются менее частые инъекции ленограстима, предлагается вводить его один раз в день, что значительно упрощает проведение курса лечения [20]. В то же время при сравнении граноцита с ПЭГ-филграстимом, последний имеет больший период полужизни и требует лишь однократного введения после окончания химиотерапевтического курса.

Клиническое применение χ Г-КСФ

Традиционно χ Г-КСФ используется в клинической онкологии и гематологии. Однако в последние годы ведутся клинические исследования препаратов этого цитокина при лечении других заболеваний. Успешное завершение проводимых исследований позволит использовать χ Г-КСФ в кардиологии, неврологии и других областях медицины.

Тяжелая наследственная нейтропения проявляется сразу после рождения. У пациентов снижено АЧН ($0-0,5 \times 10^9$ /л). В костном мозге не происходит созревания клеток – предшественников нейтрофилов, дифференцировка останавливается на стадии промиелоцитов или миелоцитов.

До введения χ Г-КСФ в клиническую практику большинство пациентов с наследственной нейтропенией умирали в первые годы жизни, обычно причиной этого являлись тяжелые инфекционные заболевания.

Применение препаратов Г-КСФ приводит к повышению уровня нейтрофилов до нормального уровня, уменьшается частота появления лихорадки, язвенного стоматита, повторных инфекций.

В то же время длительная терапия с использованием чГ-КСФ имеет ряд побочных эффектов: у пациентов отмечается спленомегалия, тромбоцитопения, остеопороз и, в 10–15 % случаев, ОМЛ.

Нейтропения нередко возникает у пациентов, проходящих курс химиотерапии при лечении онкологических заболеваний – уровень нейтрофилов падает до критического, менее $0,5 \times 10^9$ /л. У больных с пониженным количеством нейтрофилов часто возникает фебрильная нейтропения. Лихорадочное состояние регистрируется примерно у 25–40 % пациентов, проходящих химиотерапевтическое лечение. Появление фебрильной нейтропении приводит к изменению режима химиотерапии – увеличению перерывов между циклами, сокращению доз препаратов, что, несомненно, снижает эффективность проводимого лечения.

Применение чГ-КСФ повышает уровень нейтрофилов и сокращает продолжительность тяжелой нейтропении.

Прямым следствием введения препаратов чГ-КСФ является снижение частоты появления язв на слизистой оболочке рта, сокращение лихорадочного периода, также уменьшается длительность госпитализации и необходимость применения антибактериальных и противогрибковых препаратов [4; 5]. Использовать чГ-КСФ рекомендуется не только после проведения химиотерапии, но и профилактически – параллельно с курсом химиотерапии [19].

Пациенты с ОМЛ подвержены возникновению бактериальных и грибковых инфекций после химиотерапевтического лечения. Препараты чГ-КСФ позволяют сократить период восстановления числа нейтрофилов с 6 до 2 дней, снизить длительность госпитализации и курса приема антибиотиков. Рекомендуется вводить препарат также пациентам, находящимся в состоянии ремиссии.

Препараты чГ-КСФ успешно используют после миелоаблативной химиотерапии и аутологичной пересадки костного мозга. Эффективен чГ-КСФ при борьбе с нейтропенией у пациентов, страдающих ОМЛ и ХМЛ.

Обнаружение эффекта *мобилизации стволовых клеток* при действии чГ-КСФ произошло во время первой фазы клинических испытаний препарата. Было отмечено, что через несколько дней после начала терапии в крови значительно повышался уровень различных клеток-предшественников (миелоидных, эритроидных, мегакариоцитов).

Это свойство чГ-КСФ используется при проведении аллогенной трансплантации стволовых клеток. Трансплантацию стволовых клеток применяют при проведении высокодозной химиотерапии и радиотерапии. Максимальное увеличение уровня стволовых гематopoэтических клеток в периферической крови наблюдается через 4–5 дней после введения чГ-КСФ.

Введение препаратов цитокина здоровым донорам перед процедурой делает трансплантацию безопасной и высокоэффективной. Отмечено, что в ряде случаев наблюдаются и побочные эффекты после введения чГ-КСФ.

Некоторые доноры жалуются на костные боли, слабость, тошноту, но в большинстве случаев прекращения введения препарата или уменьшения дозы не требуется.

Показан эффект чГ-КСФ при лечении *пневмонии*. Несмотря на широкое использование антибиотиков, смертность от пневмонии остается достаточно высокой.

Возникновение бактериальной инфекции в нижних дыхательных путях вызывает противовоспалительный ответ: резко повышается уровень провоспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-1) и увеличивается число полиморфоядерных нейтрофилов (ПМН). Нейтрофилы являются основным фактором обеспечивающим борьбу с бактериями в легких путем фагоцитоза.

Эндогенный чГ-КСФ стимулирует выход полиморфоядерных нейтрофилов из костного мозга, их деление и активацию. Показано, что этот цитокин ингибирует апоптоз ПМН, увеличивая время жизни и функционирования этих клеток [26]. Однократное введение препарата чГ-КСФ пациентам, страдающим внебольничной пневмонией, значительно сокращало количество бактерий и снижало тяжесть и частоту возникновения сепсиса [7].

Режимы дозирования чГ-КСФ на примере Нейпогена представлены в табл.

Таблица

Режимы дозирования Нейпогена при различных показаниях

Показание	Доза	Режим
Тяжелая хроническая нейтропения	12 мкг/кг в сутки подкожно	Ежедневно для поддержания АЧН на уровне не менее 1500 на 1 мкл
Мобилизация стволовых клеток-предшественников	Без проведения ХТ 10 мкг/кг в сутки подкожно	В течение 6 суток
	Совместно с химиотерапией 5 мкг/кг в сутки подкожно	Ежедневно до нормализации уровня АЧН
Пересадка костного мозга	10 мкг/кг в сутки внутривенно или подкожно	Ежедневно со дня пересадки до достижения требуемого уровня АЧН
Нейтропения, вызванная проведением химиотерапии	5 мкг/кг в сутки внутривенно или подкожно	Ежедневно, спустя 24 ч после завершения ХТ. Вводить до достижения требуемого уровня АЧН, но не дольше 10–14 дней

Перспективные пути применения чГ-КСФ

Ряд исследований последних лет дает основания предполагать, что чГ-КСФ является одним из перспективных препаратов для лечения *нейродегенеративных заболеваний* и последствий инсульта [18; 22; 27].

В настоящее время пациентам, перенесшим острый ишемический инсульт, назначают тромболитические агенты – урокиназу и тканевой активатор плазминогена, хотя использование этих препаратов сопровождается рядом побочных эффектов [35].

Показано, что Г-КСФ обладает нейропротективным эффектом [14]. Экспрессия этого цитокина и его рецептора в центральной нервной системе указывает на возможность существования защитного сигнального пути, который активируется при поражениях головного мозга. Например при очаговой ишемии, уровень транскрипции нейронального Г-КСФ возрастает в 100 раз [29].

Нейрональный Г-КСФ рецептор, возможно, способен стимулировать работу индуктора апоптоза, вызывающего программируемую гибель нейронов. Введение Г-КСФ обеспечивает антиапоптотический эффект, запуская ряд сигнальных каскадов, в частности, вовлекая Bcl-2, Jak-STAT. Применение Г-КСФ приводит к увеличению количества клеток, экспрессирующих нейрональные факторы, характерные для зрелых нейронов. Это указывает на способность данного цитокина регулировать дифференцировку взрослых стволовых нервных клеток.

Обладая большим количеством функций и способностью проходить через гематоэнцефалический барьер, Г-КСФ является перспективным препаратом для лечения инсульта. Этот цитокин успешно показал себя в исследованиях на животных, однако обширных клинических исследований не было проведено [29].

У больных, страдающих вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), нейтропения возникает в 35–75 % случаев. Считается, что причиной снижения уровня нейтрофилов, является нарушение регуляции их дифференцировки и пролиферации цитокинами. Так, отмечается, что уровень чГ-КСФ в организме у пациентов с ВИЧ и нейтропенией значительно ниже, чем у больных, перенесших химиотерапию.

Проведенные клинические исследования у пациентов с ВИЧ показали, что применение филграстима приводит к значительному повышению уровня нейтрофилов [15]. Поддержание уровня нейтрофилов важно для таких пациентов с выявленной нейтропенией. Снижение уровня нейтрофилов требует отмены ряда миелосупрессивных препаратов (ганцикловира, триметоприм/сульфаметоксазола, пириметаминна), что приводит к прогрессированию болезни. Введение филграстима позволяет не прекращать лечение и использовать большие дозы миелосупрессивных препаратов.

ВИЧ-инфицированные, страдающие нейтропенией, больше подвержены бактериальным инфекциям. Использование филграстима приводит к значительному сокращению случаев возникновения инфекций, сроков госпитализации и увеличивает выживаемость больных [16].

Эксперименты на мышах дают основания предполагать, что терапия с использованием Г-КСФ эффективна при лечении *острого инфаркта миокарда*. В группах животных, получавших цитокин, отмечалось сокращение смертности, восстановление сердечной функции, снижение количества апоптотических клеток и увеличение капилляров по сравнению с приграничной зоной.

Было показано, что лечение, начатое непосредственно после возникновения острого инфаркта миокарда, оказалось более эффективным, чем терапия, проводимая на 3–7 дней позже [30].

Логичным продолжением успешно проведенных экспериментов на животных стали клинические испытания чГ-КСФ среди пациентов с острым инфарктом миокарда [8; 10; 31]. Результаты этих исследований разнородны [2]. Из-за отсутствия единого протокола невозможно сравнить полученные данные.

Дать ответ на вопрос об эффективности терапии с использованием чГ-КСФ при остром инфаркте миокарда, можно лишь после утверждения единого протокола проведения терапии.

В настоящий момент необходимо разработать общую схему проведения клинических испытаний, где будет указана доза вводимого препарата, способ и продолжительность введения. Изменение дизайна исследования сделает возможным оценить эффективность чГ-КСФ при лечении пациентов с инфарктом в анамнезе.

Несколько клинических исследований Г-КСФ выявило его *иммунорегуляторный эффект*. Введение препарата приводит к увеличению общего количества Т-клеток в организме и изменению числа клеток в каждой из Т-клеточных субпопуляций. Предположительно, в результате действия Г-КСФ экспрессируется транскрипционный фактор GATA-3 и супрессор цитокинового сигнала 3 SOCS3. GATA-3 и SOCS3 осуществляют контроль над пролиферацией и дифференцировкой Т-хелперов (Тх), обеспечивая развитие иммунного ответа по типу Тх2 и смещение баланса Тх1/Тх2 в сторону Тх2 [37; 39].

В экспериментах на мышах Г-КСФ препятствовал формированию реакции «трансплантат-против-хозяина», стимулируя Тх2-иммунный ответ. В группах мышей с аутоиммунным энцефаломиелитом (моделью рассеянного склероза), которым вводили препарат Г-КСФ, был существенно снижен уровень демиелинизации и зафиксировано меньшее количество воспалительных реакций [38]. Положительный эффект был достигнут и при исследовании действия Г-КСФ на других моделях аутоиммунных заболеваний.

С другой стороны, при испытаниях препарата на моделях ревматоидного артрита, системной красной волчанки и некоторых других заболеваний отмечалось обострение болезни и ряд других побочных эффектов.

Все это свидетельствует о том, что, несмотря на очевидную роль Г-КСФ в формировании адаптивного иммунитета, требуется более полное изучения действия этого цитокина и тщательное проведение клинических испытаний.

Заключение

Исследования последних лет показали, что чГ-КСФ способен не только стимулировать рост нейтрофилов, но и обладает нейропротективным и иммуномодуляторным эффектом.

Успех в экспериментах на животных моделях и ряд проведенных клинических испытаний дают основания предполагать, что этот цитокин является перспективным препаратом для лечения инсульта, инфаркта миокарда, а также аутоиммунных заболеваний. Это значительно расширит область клинического применения рекомбинантного чГ-КСФ, сделав возможным его использование не только в онкологической практике, но и в других областях медицины.

Литература

1. Птушкин В.В. Роль гранулоцитарного и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующих факторов в лечении инфекции при нейтропении // Современная онкология. – 2001. – Т.3, № 3. – С. 23–8.
2. Abdel-Latif A., Bolli R., Zuba-Surma E.K. et al. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // American heart journal – 2008. – 156(2). – P. 216–26.
3. Avalos B.R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor // Blood. – 1996. – 88(3). – P. 761–77.
4. Clark O.A., Lyman G., Castro A.A. et al. Colony stimulating factors for chemotherapy induced febrile neutropenia // Cochrane Database Syst Rev. – 2003. – 3. – CD003039.
5. Crawford J., Tomita DK., Mazanet R. et al. Reduction of oral mucositis by filgrastim (r-metHuG-CSF) in patients receiving chemotherapy // Cytokines Cell Mol Ther. – 1999. – 5(4). – P. 187–93.
6. Demetri G.D., Griffin J.D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor // Blood. – 1991. – 78. – P. 2791–808.
7. Droemann D., Hansen F., Aties S.P. et al. Neutrophil apoptosis, activation and anti-inflammatory cytokine response in granulocyte colony-stimulating factor-treated patients with community-acquired pneumonia // Respiration. – 2006. – 73. – P. 340–6.
8. Ellis S.G., Penn M.S., Bolwell B. et al. Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction: results of a pilot dose-escalation randomized trial // American Heart Journal. – 2006. – 153(6). – P. 41.
9. Golde D., Cline M. Regulation of granulopoiesis // N England J Med. – 1974. – 291(26). – P. 1388–95.
10. Harada M., Qin Y., Takano H. et al. G-CSF prevents cardiac remodelling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes // Nature Medicine. – 2005. – 11(3). – P. 305–11.
11. Hill C.P., Osslund T.D., Eisenberg D. The structure of granulocyte colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors // Biochemistry. – 1993. – 90. – P. 5167–71.
12. Hoglund M. Glycosylated and non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) – what is the difference? // Medical oncology. – 1998. – 15(4). – P. 229–33.
13. Kirsch F., Kruger C., Schneider A. The receptor for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is expressed in radial glia during development of the nervous system // BMC Dev Biol. – 2008. – 8. – P. 32.
14. Komine-Kobayashi M., Zhang N., Liu M. et al. Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice // J Cereb Blood Flow Metab. – 2006. – 26(3). – P. 402–13.
15. Kuritzkes D.R., Parenti D., Ward D.J. et al. Filgrastim prevents severe neutropenia and reduces infective morbidity in patients with advanced HIV infection: results of a randomized, multicenter, controlled trial // AIDS. – 1998. – 12. – P. 65–74.
16. Kuritzkes D.R. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor // clinical infection disease. – 2000. – 30. – p. 256–60.
17. Layton J.E., Shimamoto G., Osslund T et al. Interaction of granulocyte-colony stimulating factor with its receptor // The Journal of Biological Chemistry. – 1999. – 274(25). – P. 17445–51.
18. Lu C-Z., Xiao B-G. G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia // Biochemical society transactions. – 2006. – 34(6). – P. 1327–33.
19. Lüftner D., Possinger K. Pegfilgrastim – rational drug design for the management of chemotherapy-induced neutropenia // Onkologie. – 2005. – 28(11). – P. 595–602.
20. Martin-Christin F. Granulocyte colony-stimulating factors: How different are they? How to make a decision? // Anti-Cancer Drugs. – 2001. – 12. – P. 185–91.
21. Maruyama K., Tsuji K., Tanaka R. et al. Characterization of peripheral blood progenitor cells mobilized by nartogastim in normal volunteers // Bone Marrow Transplantation. – 1998. – 22. – P. 313–20.
22. Minnerup J., Sevimli S., Schabitz W-R. Granulocyte colony-stimulating factor for stroke treatment: mechanisms of action and efficiency in preclinical studies // Experimental and translational stroke medicine. – 2009. – 1. – P. 2.
23. Molineux G., Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients // Anti-Cancer Drugs. – 2003. – 14(4). – P. 259–65.
24. Mortsyn G., Burgess A.W. Hemopoietic growth factors: a review // Cancer research. – 1988. – 48. – P. 5624–37.
25. Sachs L. The molecular control of blood cell development // Science. – 1987. – 238(4832). – P. 1374–9.
26. Sakamoto C., Suzuki K., Hato. et al. Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway // Int J Hematol. – 2003. – 77(1). – P. 60–70.
27. Schabitz W.R., Kollmar R., Schwaninger M. et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia // Stroke. – 2003. – 34(3). – P. 745–51.
28. Shimoda K., Okamura S., Harada N. et al. Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulated factor on platelets // J.Clin. Invest. – 1993. – 91. – P. 1310–3.
29. Shneider A., Kruger C., Steigleder T. et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand the counteracts programmed cell death and drives neurogenesis // J Clin Invest. – 2005. – 115. – P. 2083–98.
30. Takano H., Komuro I. G-CSF therapy for acute myocardial infarction: studies of animal experiments give valuable hints to clinical trials // International Journal of Cardiology. – 2009. – 135. – P. 115–6.
31. Takano H., Ueda K., Hasegawa H., Komuro I. G-CSF therapy for acute myocardial infarction // Trends in pharmacological sciences. – 2007. – 28(10). – P. 512–7.

32. Tanaka H., Tanaka Y. Shinagava K. et al. Three types of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor have equivalent biological activities in monkeys // Cytokine. – 1997. – 9(5). – P. 87–91.
33. Tatsuda D., Arimura H., Tokunaga H. et al. Expression and purification of cytokine receptor homology domain of human granulocyte colony-stimulating factor receptor fusion protein // Protein expression and purification. – 2001. – 21. – P. 87–91.
34. Uzumaki H., Okabe T., Sasaki N. et al. Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1989. – 86. – P. 9323–6.
35. Weintraub M. Thrombolysis (tissue plasminogen activator) in stroke: a medicolegal quagmire // stroke. – 2006. – 37. – p. 1917–22.
36. Willis F., Pettengell R. Pegfilgrastim // Expert Opin Biol Ther. – 2002. – 2(8). – P. 985–92.
37. Yu C-R., Mahdi R., Ebong S. et al. Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells // The journal of biological chemistry. – 2003. – 278(32). – P. 29752–9.
38. Zavala F., Abad S., Ezine S. et al. G-CSF therapy of ongoing experimental allergic encephalomyelitis via chemokine- and cytokine-based immune deviation // J Immunol. – 2002. – 168. – P. 2011–9.
39. Zheng W., Flavell R.A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells // Cell. – 1997. – 89. – P. 587–96.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616-073.755.4:615.832:546-022.53

*Н.Л. Шимановский¹, В.Н. Кулаков², Е.Ю. Григорьева³, А.А. Липенгольц²***НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ**¹*Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва*²*Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва*³*РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Шимановский Николай Львович, д-р мед. наук, чл-корр. РАМН, зав. кафедрой РГМУ им. Н.И. Пирогова***адрес:** 119021, Москва, Б. Пироговская, д. 9а; **тел.** +7(916)650-31-49;**e-mail:** shiman@rsmu.ru

Статья поступила: 16.01.2011, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

В работе рассматриваются основные свойства магнито-резонансных контрастных средств, нашедших применение в клинической практике при диагностике злокачественных новообразований. В работе обсуждаются перспективы создания наночастиц оксида железа – препарата для МРТ-диагностики. На примере препарата комбидекс обсуждаются основные его свойства, включая появление T_1 и T_2 взвешенных МРТ-изображений. Рассматриваются основные пути поиска новых контрастных лекарственных средств на основе известных результатов их клинического изучения. Использование магнитных наночастиц на основе сложных оксидов железа в онкологии весьма перспективно. Наночастицы оксида железа благодаря своим магнитным свойствам могут стать инструментом как для визуализации, так и для лечения этих новообразований.

Ключевые слова: магнито-резонансная томография, контрастные лекарственные средства, диагностика, наночастицы, оксид железа, фармакологические свойства.

*N.L. Shimanovsky¹, V.N. Kulakov², E.Yu. Grigorieva³, A.A. Lipengolz²***IRON OXIDE NANOPARTICLES AS A DIAGNOSIS TOOL AND BASIC
FOR HYPERTHERMIA THERAPY IN CANCER**¹*Russian federal medical N.I. Pirogov's university, Moscow*²*Federal Medical Biophysical Burnasyan's Centre of FMBA of RF, Moscow*³*Russian N.I. Blokhin's Cancer Research Centre RAMS, Moscow***Abstract**

In this study the basic properties of magnetic resonance imaging contrasts of applying in clinic practice for diagnosis of malignant neoplasia are discussed. The paper discusses the prospects of creating nanoparticles of iron oxide – preparation for the MRI diagnosis. As an example of the preparation of nanoparticles we use Kombideks which is known to pass appearance of T_1 and T_2 weighted MRI images. Based on a clinical study of contrast agents derived from various chemical compounds, we analyze the perspective directions of the creation of new contrast agents for MRI. We postulate, that the use of magnetic nanoparticles composed of complex oxides of iron is very promising in oncology. In summary, nanoparticles of iron oxide due to its magnetic properties can be used as tool for visualization and treatment of tumors.

Key word: magnetic resonance imaging, contrast's drugs, diagnostics, nanoparticles, oxides of iron, pharmacologic property.

Введение

По частоте возникновения онкологические заболевания занимают одно из ведущих мест. В нашей стране ежегодное количество первичных онкологических больных достигает 500 000. Ранняя диагностика ЗНО является залогом успеха проводимых терапевтических мероприятий, среди которых все более востребованной становится лучевая терапия (ЛТ): в ее применении нуждаются около 70 % онкологических больных. Поэтому прогресс в современной онкологии во многом определяется развитием методов лучевой диагностики, среди которых все большую роль играет МРТ, и ЛТ.

Прогресс в области МРТ обеспечивают два обстоятельства: совершенствование аппаратной базы и появление серии магнито-резонансных контрастно-диагностических средств (МРКС). Достаточно сказать, что в последнее десятилетие в качестве рутинных диагностических систем исполь-

зуются магнито-резонансные томографы на основе магнитов с напряженностью магнитного поля в 1,5 Тл и все шире внедряются томографы с величиной этого поля 3,0 Тл. Современные МР-томографы обладают высокосоввершенными программами обработки первичных данных, что обеспечивает возможность проводить исследование в любых плоскостях с учетом анатомических особенностей тела пациента, а при необходимости – получать трехмерные изображения для точной оценки распространенности патологического процесса. Более того, МРТ является единственным методом неинвазивной диагностики, обладающим высокой чувствительностью и специфичностью при выявлении отека и инфильтрации мягких тканей. Развитие МР-спектроскопии и диффузионной МРТ, а также создание новых органотропных контрастных препаратов является основой развития «молекулярной визуализации» и позволяет проводить дифференциальную диагностику *in vivo* [9].

Основные свойства МРКС

Применение МРКС в онкологии

МРТ внутренних органов – метод лучевой диагностики, внедренный в клиническую практику около 20 лет назад, поднял современную медицину на качественно новый уровень, что еще раз было подтверждено в 2003 г. присуждением Нобелевской премии Paul C. Lauterbur из США и Peter Mansfield из Великобритании за их работы в области магнитно-резонансной визуализации. Всего лишь через несколько лет после появления МРТ ученые добились важного прорыва в совершенствовании этого вида лучевой диагностики, разработав контрастное средство для магнитно-резонансной визуализации и опровергнув тем самым первоначальное мнение, что для МРТ не нужны вещества для искусственного контрастирования. Сейчас МРКС составляют неотъемлемую часть клинической МРТ, так как позволяют значительно увеличить объем получаемой при исследовании диагностической информации [8; 10–12].

Впервые парамагнитное ускорение протонной релаксации было продемонстрировано Блохом (1944), когда к воде был добавлен нитрат железа. Математически процесс релаксации протонов при добавлении парамагнетиков был описан Саламоном (1955), уравнения которого позже были модифицированы Блюмербергером (1957). Механизм влияния парамагнитных соединений включает относительное движение парамагнитного иона металла и близлежащих водных молекул. При этом важную роль играет структура парамагнитного соединения, которая определяет доступность молекул воды для парамагнитного центра [12]. Впервые искусственно изменить сигнал магнитного резонанса ядер водорода *in vivo* с помощью экзогенного химического соединения удалось Лаутербуру (1978) в экспериментах по уменьшению времен магнитно-резонансной релаксации протонов миокардиоцитов собаки с помощью внутривенного введения соли марганца. В дальнейшем оказалось, что среди различных парамагнитных элементов наибольшей релаксирующей активностью обладает редкоземельный лантаноид гадолиний. Именно на его основе были созданы первые МРКС гадопентетат димеглюмина (Gd-DTPA, магневист), с помощью которых можно искусственно изменять магнитные параметры протонов водорода в тканях и органах и четко визуализировать границы опухолей и других патологических очагов при проведении МРТ [7].

Первоначально магневист использовали только для исследования головного и спинного мозга, а затем и всего тела (Япония, 1992; США, 1993; ФРГ, 1993 и многие другие страны). Он был первым МРКС, разрешенным для применения у детей, включая новорожденных, для введения в тройной болюсной дозе и для проведения магнитно-резонансной ангиографии (МРА).

Механизм контрастирующего эффекта гадолиниевых МРКС заключается в том, что гадолиниевый ион укорачивает время спин-решеточной релаксации возбужденных ядер атомов, увеличивая интенсивность сигнала и повышая контрастность изображения определенных тканей при использовании соответствующей последовательности сканирования (например, T1-взвешенного спинного эхо). Важно понимать, что улучшение контрастирования патологического очага внеклеточными МРКС обусловлено патофизиологическими механизмами, связанными с нарушением сосудистой проницаемости, либо с изменением кровотока, либо с индукцией ангиогенеза. Именно поэтому МРКС позволяют четко контрасти-

ровать метастазы опухолей в головном мозге, так как метастазы не имеют гематоэнцефалического барьера, в норме не проницаемого для внеклеточных МРКС. Магневист выявляет дополнительные метастазы у 52 % больных, позволяет получить дополнительную информацию при первичных опухолях головного мозга по критерию выявляемости в 16 % случаев, при метастазах в разных частях тела (такие образования имеют как большее число сосудов, так и сосуды с повышенной проницаемостью, что приводит к более быстрому накоплению и более быстрому вымыванию МРКС); позволяет более точно определить объем опухолевого поражения, выявить солидные и кистозные компоненты опухоли, сопутствующий отек и очаги некроза у 46 % больных; рубцовые изменения тканей – в них увеличено внеклеточное пространство и больше накапливается МРКС.

Как правило, объем диагностической информации, получаемый с помощью МРКС, можно значительно увеличить, наблюдая за контрастированием в динамике. Современные сверхбыстрые импульсные последовательности позволяют непрерывно следить за изменением интенсивности сигнала в зоне интереса и делать однозначные выводы не только о природе патологии, но и о васкуляризации некоторых опухолей, а также прогнозе развития заболевания.

По мере развития МРТ и внедрения в практику ультраскоростных программ сканирования широкое распространение получила динамическая контрастная МРТ с использованием болюсного введения МРКС [1; 10]. При этом установлено, что данная методика позволяет получить ценные данные для дифференциальной диагностики различных опухолей, а также определения степени их злокачественности. Оказалось, что в первую минуту после введения магневиста менингиомы контрастируются быстрее, чем невриномы [5]. Точно также краниофарингиомы быстрее накапливают МРКС, чем аденомы гипофиза. С другой стороны, скорость проникновения МРКС через поврежденный гематоэнцефалический барьер у больных с глиобластомой значительно выше, чем у пациентов с доброкачественной астроцитомой.

При МРТ спинного мозга МРКС широко используют для диагностики и дифференциальной диагностики интра- и экстрамедуллярных опухолей, определения границ и структуры новообразований, расположенных в позвоночном канале и экстравертебрально. Применение МРКС позволяет уверенно отграничить солидный компонент новообразования от опухолевой кисты и сопутствующей сирингомиелиии, что имеет большое значение для выбора места ламинэктомии. Кроме того, с помощью контрастного усиления, как правило, удается выявить распространение опухоли за пределы позвоночного канала («песочные часы»), а также метастазирование по субарахноидальному пространству.

Чрезвычайно ценные данные можно получить при введении МРКС больным с рецидивами или продолженным ростом опухоли, когда на фоне послеоперационных изменений рубцово-спаечного характера не возможно решить вопрос о наличии или отсутствии опухолевого поражения [6].

В РФ зарегистрированы четыре внеклеточных парамагнитных МРКС, содержащие хелатные комплексы иона гадолиния низкой молекулярной массы, которые успешно прошли клинические испытания (см. табл.) и широко используются в клинической практике, а также органотропное МРКС – гадоксетовая кислота (примовист).

Таблица

Основные физико-химические и биохимические свойства внеклеточных МРКС, зарегистрированных в России [8; 11]

Показатель	Магневист	Дотарем	Омнискан	Гадовист
Термодинамическая стабильность (logK)	22,5	25,8	16,9	21,8
T1-релаксационная активность в плазме, $\text{мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$	4,8	4,3	4,4	5,6
Осмоляльность, осм/кг (H_2O при 37 °C)	1,960	1,350	0,798	0,557
Связывание с белками	1	–	2,1	2,7
Высвобождение гистамина I_{50} , ммоль/л	140	110	110	>250

По влиянию на время релаксации парамагнитные вещества делят на преимущественно влияющие на T1 или T2. Так, например, магневист и целый класс наиболее широко используемых гадолинийсодержащих МРКС влияют на T1, увеличивая интенсивность магнитно-резонансного сигнала тканей-мишеней, «осветляя» область интереса на T1-взвешенных изображениях, благодаря укорочению T1 [1]. А супермагнитные (например, оксид железа) и ферромагнитные частицы, обладая большим магнитным моментом, индуцируют локальные неоднородности поля, уменьшая тем самым преимущественно время T2. При этом получают негативное усиление, то есть они делают область накопления препарата более темной, что наиболее ярко проявляется на T2-взвешенных изображениях [17].

Классификация МРКС по фармакокинетическим свойствам

Данные о фармакокинетике МРКС свидетельствуют о целесообразности деления их на внеклеточные (тканеспецифические) и внутриклеточные или органотропные (тканеспецифические). Внеклеточные МРКС уже достаточно давно (с 1988 г.) широко применяют при проведении МРТ. Тканеспецифические внутриклеточные (резовист, тесласкан, примовист) начали применять лишь в последние 10 лет.

1. *Внеклеточные препараты (внутрисосудистое или полостное введение).* Истинные внеклеточные вещества имеют небольшую молекулярную массу, распределяются во внеклеточном пространстве. T1 (позитивные) вещества – Gd-DTPA и другие хелатные комплексы парамагнитных веществ; T2 (негативные) вещества – Dys-DTPA (диэтилтриаминпентаацетат диспрозия), Dys-DTPA-BMA (диэтиламинтрипентаацетата бисметиламид диспрозия) и другие хелатные комплексы диспрозия (в клинике не применяют).

- 1.1 Длительно циркулирующие в крови вещества вследствие обратимого связывания с сывороточными альбуминами. T1 (позитивные) вещества – гадоверсетамид (вазовист).

- 1.2 Ангиографические макромолекулярные вещества для количественного определения объема и скорости тока крови, маркеры дисфункции капиллярной системы. T1 (позитивные) вещества – комплексы Gd-DTPA (других парамагнитных T1-позитивных веществ) с декстраном, альбумином или полилизинном, инкапсулированные в липосомы. T2 (негативные) вещества – хелатные комплексы диспрозия, ковалентно связанные с альбумином.

Основные фармакокинетические характеристики внеклеточных МРКС: незначительно связы-

ваются с белками плазмы крови (<5 %); быстро распределяются между внутрисосудистым и интерстициальным пространством с периодом полураспределения около 3–10 мин после внутривенного введения [3]; выводятся, преимущественно, почками путем гломерулярной фильтрации (>98 %); пролонгированно, но в полном объеме выводятся при почечной недостаточности (при скорости гломерулярной фильтрации более 20 мл/мин); легко удаляются при гемодиализе; очень незначительно элиминируют через другие органы (<2 %), в том числе с грудным молоком (<0,05%) [13]; не подвержены энтерогепатической рециркуляции; медленно пассивно диффундируют через большинство интактных гистогематических барьеров; не проходят через интактные гематоэнцефалический и плацентарный барьеры; период полувыведения около 1,5–2 ч; эффективность контрастирования пропорциональна дозе; не подвергаются биотрансформации.

2. *Тканеспецифические препараты, распределение которых связано с взаимодействием с клетками.*

- 2.1 Гепатотропные вещества (внутривенное введение), поглощающиеся преимущественно гепатоцитами. T1 (позитивные) вещества – Gd-EOB-DTPA (диэтиламинотрипентаацетат этоксибензил гадолиния, примовист). T2 (негативные) вещества – ультрамаленькие суперпарамагнитные частицы оксида железа (<20 нм – USPIO), покрытые асиалогликопротеином, арабиногалактаном или другими стабилизаторами.

- 2.2 Вещества, специфически накапливаемые ретикуло-эндотелиальной системой – в печени (Купферовскими клетками), селезенке, лимфатических узлах, костном мозге. T1 (позитивные) вещества – липосомы, содержащие парамагнитные T1- вещества (в клинику не внедрены). T2 (негативные) вещества – суперпарамагнитные частицы оксида железа (70–400 нм), например резовист.

- 2.3 Вещества, накапливаемые поджелудочной железой – T1 (позитивные) вещества: мангафодипир.

- 2.4 Опухолеспецифические вещества. T1 (позитивные) вещества – моноклональные антитела, пептиды (гормоны, медиаторы), соматотропин и другие вещества, связанные с небольшими комплексами парамагнитных T1-веществ; металлопорфирины. T2 (негативные) вещества – те же бионосители, связанные с большими комплексами парамагнитных веществ, влияющих на T2.

В клинической практике уже используют некоторые тканеспецифические МРКС – примовист (гадоксетовая кислота), резовист (гадобенат димегломина Gd-BOPTA), тесласкан (мангафодипир, Mn-DPDP) [11] и др.

Из группы гепатотропных МРКС наиболее широко известен примовист (гадоксетовая кислота, Gd-ЕОВ-ДТРА). Он отличается от магневиста наличием этоксибензильной боковой цепи, которая определяет высокое сродство вещества к гепатоцитам и позволяет контрастировать печень. Благодаря снижению T1-релаксации примовист позволяет не только выявлять опухоли печени, но и определять их природу, давая возможность исследовать кинетику накопления и выведения МРКС в структурах печени.

Mn-DPDP при клинической оценке показал значительное увеличение отношения сигнал/шум на T1-взвешенных томограммах. Он оказался эффективным при получении T2-взвешенных (последовательность SE) и T1-взвешенных (последовательность GR) томограмм цирротических узлов и карциномы печени [11].

При проведении МРТ головного и спинного мозга МРКС применяют, в первую очередь, для обнаружения опухолей и последующей дифференциальной диагностики: при подозрении на менингиому, невриному, в том числе слухового нерва, опухоли с инфильтративным ростом (например, глиому и метастазы); для обнаружения небольших опухолей и/или плохо контрастирующихся опухолей; при подозрении на рецидив опухоли после операции или лучевой терапии; для дифференцированного изображения таких редких опухолей, как гемангиобластома, эпиндиомы и небольшие аденомы гипофиза; для более точного определения интракраниального распространения первичных вне-мозговых опухолей.

Дополнительно при спинальной МРТ МРКС позволяют проводить дифференциальную диагностику интрамедуллярных и экстрамедуллярных опухолей, определять солидные части опухолей при кистозных формах, оценивать распространенность интрамедуллярных опухолей. В случае МРТ всего тела МРКС улучшают контрастирование лицевой части головы, области шеи, грудной и брюшной полости, молочных желез, органов таза, а также опорно-двигательного аппарата.

Благодаря МРКС можно подтвердить или исключить наличие опухолей, воспалений, и сосудистых поражений; определить распространенность и локализацию этих процессов; дифференцировать внутреннюю структуру этих повреждений; определить степень демиелинизации при рассеянном склерозе; оценить кровоснабжение нормальных и патологически измененных тканей; отличить опухолевые ткани от рубцовых после лучевой терапии; выявить рецидив грыжи межпозвонкового диска после операции; провести полуколичественную оценку функции почек, сочетая их с изучением макроструктурных данных.

Важным направлением поиска селективных МРКС стало получение наночастиц оксида железа диаметром 5–35 нм (супермагнитные вещества, такие как магнетит (Fe_3O_4); магнит (Fe_2O_3) и феррит (Fe_2O_3)), покрытых декстраном или его производными. Среди железосодержащих МРКС выделяют:

SPIO – суперпарамагнитный оксид железа;

USPIO – суперпарамагнитный оксид железа сверхмалого размера;

МНОН – монокристаллический оксид железа.

Препараты SPIO (Fe_2O_3) имеют кристаллическую структуру и сильно ускоряют протонную релаксацию тканей [3]. Диаметр частиц SPIO меньше эритроцита, что позволяет им проникать через капиллярную сеть. Разработанные препараты SPIO имеют необходимые величины заряда и размера

для избирательного поглощения клетками ретикуло-эндотелиальной системы. После деградации SPIO в ретикуло-эндотелиальной системе атомы железа включаются в состав гемоглобина эритроцитов. Количество железа, поступающего в организм в составе SPIO при диагностике, значительно ниже общей величины депо железа [11]. По мнению большинства исследователей, SPIO относятся к тканеспецифическим МРКС. Они тропны к клеткам ретикуло-эндотелиальной системы и позволяют контрастировать печень, селезенку и красный костный мозг [2; 4]. SPIO улучшают диагностику диффузных и очаговых поражений селезенки [11], а также позволяют дифференцировать пораженные метастазами лимфатические узлы от нормальных. Применение SPIO при МРТ диагностике очаговых поражений печени у 900 больных обеспечивает высокую чувствительность (93,8 %) и специфичность (91,5 %) метода. МРТ в сочетании с USPIO позволяет улучшить контрастирование опухолей костного мозга и дифференцировать опухолевые очаги от участков гиперплазий. USPIO позволяют отличить реактивно увеличенные лимфатические узлы от злокачественных опухолей [11]. Частицы суперпарамагнитного оксида железа обеспечивают получение ценной диагностической информации при злокачественных опухолях печени, а также при наличии гемангиом, кист, узловых гиперплазий.

Важнейшей задачей, которую возможно решать с помощью суперпарамагнитных наночастиц магнетита, является диагностика очагов онкологических заболеваний на ранней стадии. Показано [10], что существует разница в значениях времен релаксации тканей различных органов при наличии первичных или вторичных опухолей. Например, в случае онкологических патологий T₁ и T₂ лимфоузлов с магнетитом меняется с 646 ± 23 мсек до 750 ± 10 мсек и 74 ± 2 мсек до 88 ± 1 мсек соответственно. Нахождение суперпарамагнитных наночастиц в области опухоли позволяет существенно повысить диагностическую точность обнаружения очагов заболеваний на ранних стадиях, а также выявить рецидивы в послеоперационный период.

При диагностике онкологических патологий учитывается тот факт, что существует два основных типа опухолей – с разветвленной сосудистой сетью и без таковой. Методики МРТ диагностики таких заболеваний различны. В первом случае контрастное средство попадает в область опухоли через сосудистую систему, причем суперпарамагнитные наночастицы обладают тем преимуществом, что попадают в самые малые сосуды из-за маленького размера, что дает возможность визуализировать особенности анатомического строения опухоли. Второй тип опухолей диагностируется с помощью насыщения контрастным веществом пространства, окружающего опухоль.

Препарат на основе наночастиц суперпарамагнитного оксида железа, покрытых декстраном, названный ферумокстраном (комбидекс) обладает выраженной контрастирующей способностью на T1 и T2-взвешенных МРТ-изображениях даже при низкой напряженности магнитного поля 0,15 тесла. Ферумокстран позволяет получать изображения опухолей в головном мозге пациентов лучшего качества, чем гадолиниевые препараты. Наночастицы оксида железа накапливались в астроцитах и макрофагах, но не опухолевых клетках. У 5 из 7 пациентов ферумокстран позволил выявить дополнительные очаги злокачественных образований по сравнению с препаратом гадолиния.

После введения ферумоксатрана увеличение T1-сигнала наблюдалось в течение 2 – 5 дней, что является несомненным преимуществом по сравнению с препаратами гадолиния, контрастирующий эффект которых исчезает через 40 мин – 1 час. Кроме того, ферумоксатран оказывал контрастирующий эффект и

при световой и даже электронной микроскопии образцов, полученных для гистологического исследования. Очень важно, что после операции, оставшиеся очаги заболевания контрастируются ферумоксатраном через день после операции и более за счет длительно времени полувыведения препарата (см. рис.).

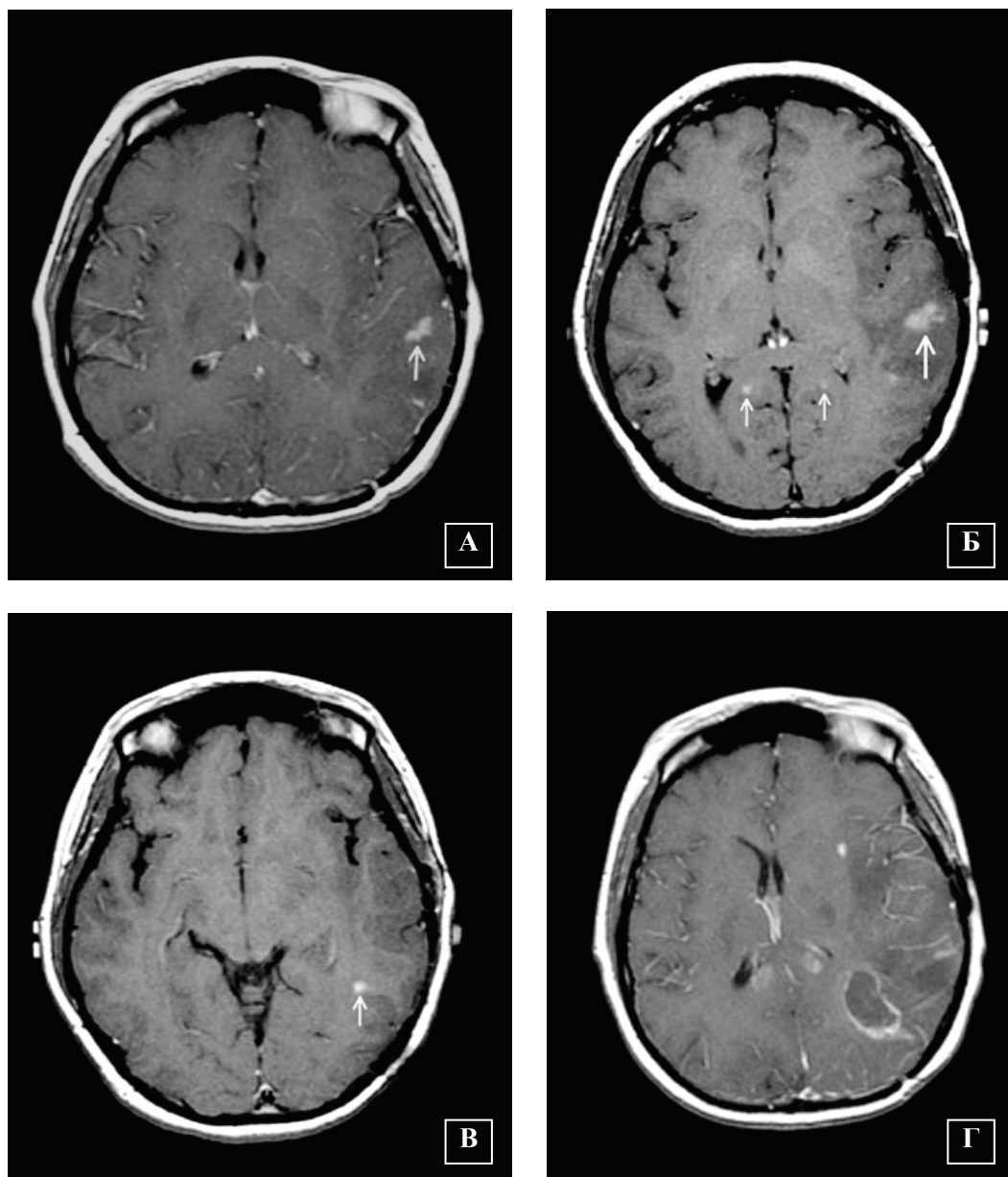


Рис. Возможности применения препаратов гадолиния и ферумоксатрана.

А: T1-взвешенное изображение после введения препарата гадолиния (стрелкой указан небольшое опухолевое образование в левой височной доле).

Б: T1-взвешенное изображение через 24 ч после введения ферумоксатрана позволяет видеть большой очаг в левой височной доле и дополнительно маленькие очаги позади splenium (маленькие стрелки).

В: Через 24 ч после введения ферумоксатрана визуализируется новый очаг в задней левой височной доле (маленькая стрелка).

Г: Через 5 месяцев на T1-взвешенном изображении введение гадолиниевого препарата позволило увидеть новые опухолевые очаги, которые не были видны после первоначального сканирования на рис. А и В. Важно, что 3 новых очага, контрастируемых гадолинием, образовались в областях, которые ранее контрастировались ферумоксатраном, но не гадолинием.

К другой клинической проблеме, которую можно решать с помощью ферумокстрана, относится определение стадии рака органов брюшной и тазовой области [22]. МРТ с контрастным усилением позволяет определить не только размер, но и морфологию лимфатического узла, и, тем самым, дать точный неинвазивный прогноз развития заболевания и определить схему лечения. Доказано, что размер лимфатического узла – это не точный критерий развития злокачественного процесса, а с помощью выявления особенностей его морфологии можно поставить дифференциальный диагноз.

Для создания органотропных контрастных средств на основе частиц суперпарамагнитного оксида железа можно использовать их конъюгаты со специфическими антителами [16].

Для диагностики и лечения онкологических заболеваний разрабатывают наночастицы магнетита со специально модифицированной поверхностью [12]. Как правило, опухолевые клетки имеют поверхностные антигены, отличающиеся от антигенов нормальных однотипных клеток. За счет этой разницы наночастицы, функционализированные антителами против таких антигенов опухолевых клеток, связываются с опухолевыми клетками и не связываются с нормальными. Такой магнитный комплекс в форме магнитной жидкости вводится в артерию, снабжающую кровью пораженный орган или опухоль, или, если это возможно, инъецируется непосредственно в опухоль. Далее нужная зона подвергается воздействию внешнего магнитного поля со строго определенными параметрами. В итоге, за счет сродства к поверхностным антигенам опухоли и парамагнитных свойств, магнетит локализуется на поверхности опухолевых клеток.

Проведены исследования по накоплению наночастиц магнетита с покрытием из Fab-фрагментов антител к изоферменту карбоангидразы IX (MN/CA IX), являющейся маркерным трансмембранным белком почечной карциномы, что позволило повысить эффективность МРТ-визуализации этой опухоли. Другим опухолеспецифическим транспортером может служить рекомбинантное моноклональное антитело трастузумаб, входящее в состав противоопухолевого средства герцептин. Трастузумаб специфически взаимодействует с рецепторами HER2/neu эпидермального фактора роста в опухоли молочной железы. Наночастицы магнетита с трастузумабом аккумулируются исключительно на поверхности тех клеток, где экспрессированы данные рецепторы.

Наночастицы магнетита можно применять в качестве МР контрастного вещества в составе липосом, которые сходны по строению с клеточными мембранами, что определяет их биосовместимость и эффективность при адресной доставке. Для повышения органотропности поверхность липосом может быть конъюгирована с антителами или химически модифицирована. Противоопухолевые препараты или радионуклиды могут быть присоединены к «магнитным контейнерам», называемых «magnetic target carrier» (магнитные носители с адресной доставкой).

Весьма интересные результаты были получены в исследованиях с использованием порфириновых соединений. Показана эффективность металлопорфиринов в качестве опухолеспецифичных МРКС при введении в их структуру парамагнитных агентов [15]. Mn^{3+} -тетрафенилсульфонат порфирина ($MnTPPS$) показал высокую контрастирующую активность в модельных экспериментах с привитой мышам NUDE подкожно карциномы толстой кишки

человека и опухоли молочной железы человека 2T [19]. Mn^{3+} -уропорфирин-1 ($Mn-UROP-1$) при исследованиях, проведенных на модели внутречерепной опухоли мозга (на крысах 9L), повышал при внутривенном введении интенсивность сигнала магнитного резонанса от ткани опухоли уже через 30 мин. Высокая интенсивность сигнала сохранялась в течении 24 ч [21].

Отметим, что Mn имеет невысокий Z, что делает его малоинтересным элементом для ФЗТ. Порфириновые комплексы с Gd и другими парамагнитными лантаноидами не описаны. Наконец, способы синтеза порфириновых производных отличаются низкой технологичностью, что является существенным недостатком при серийном производстве подобных лекарственных средств.

При формировании комплексов МРКС с моноклональными антителами можно получить высокоспецифичные МРКС не только к нормальным, но и к патологически измененным тканям. В экспериментах уже получены такие комплексы, например иммуноспецифичные – к эмбриональному антигену карциномы прямой кишки [12].

К сожалению, исследователи выявили и целый ряд препятствий на пути создания МРКС с опухолевой специфичностью. Главное – это малое количество доступных связывающих мест на поверхности малигнизированных клеток и сравнительно низкая специфичность полученных антител.

Биотрансформация комплекса МРКС и антитела в организме начинается, прежде всего, с отщепления иммуноглобулина и, соответственно, потери специфичности. Здоровая печень, очищая кровь от инородных белков, тем самым во-первых, сокращает время жизни комплекса в организме, во-вторых, осуществляет неспецифическую аккумуляцию комплекса МРКС с антителами в печени, что делает проблематичным диагностику локализованной в печени опухоли [12].

Применение полимерных веществ

Связывание гадолиниевого комплекса с полимерной молекулой сочетает функциональную диагностику с эффективностью высокого разрешения МРТ. Для контрастирования сосудов Gd-DTPA ковалентно связывают с такими макромолекулярными веществами, как альбумин, декстран, полилизин и другие. МРКС этого типа в экспериментах на животных позволили улучшить качество томограмм артерий и вен диаметром менее 1 мм. Их также можно использовать для прямой и непрямой магнитно-резонансной лимфографии.

Было выявлено, что такие комплексы-МРКС могут проходить гематоэнцефалический барьер не только в случае грубых нарушений целостности сосудистого русла, но и при повышенной капиллярной проницаемости (например, при воспалении в активной фазе, при опухолях и при ишемии) [11]. Однако при введении таких макромолекулярных МРКС становится актуальной проблема возможной сенсibilизации организма.

С помощью метода ферментсвязанной иммуносорбентной пробы ELISA показано [11], что при сенсibilизации крыс комплексами Gd-DTPA-альбумин, Gd-DTPA-димеглюмин, Gd-DTPA-декстран и Gd-DTPA-полилизин начинается выработка антител класса IgG, специфичных против Gd-DTPA. Несомненно, требуются дополнительные исследования, чтобы определить потенциал иммунного ответа человека к макромолекулярным МРКС в условиях их клинического использования.

Наночастицы оксида железа в магнитной гипертермии опухолей

В последние годы активно развиваются различные варианты локальной магнитной гипертермии, в которой вводимый в пораженный участок магнитный материал нагревается извне с помощью электромагнитного излучения диапазона 100–800 кГц, которое практически не поглощается тканями организма, но интенсивно взаимодействует с ферро- и суперпарамагнетиками [14; 18; 21].

В качестве медиаторов могут выступать как наночастицы оксидов железа и различных сплавов, потенциально способные проникать внутрь клеток, так и более крупные субмикронные частицы биосовместимых ферромагнетиков, располагающиеся в межклеточном пространстве.

Явление нагревания магнитных частиц в переменном магнитном поле можно использовать при лечении раковых опухолей. Основным параметром при выборе материала является высокое удельное поглощение, благодаря которому частицы выделяют много тепла при воздействии магнитного поля, минимизируя требуемую дозу вводимых в организм наночастиц, а также область их воздействия, то есть степень повреждения здоровых тканей. Однако для клинического использования важно еще и иметь возможность наблюдать за местонахождением частиц в организме прежде, чем начинать лечение. Для визуализации с помощью магнитного резонанса подходят высокодисперсные частицы суперпарамагнитного оксида железа, но они не обладают достаточно высоким значением удельного поглощения. Поэтому предложено покрывать наночастицы железа тонкой оксидной пленкой.

Помимо того, что оксидная пленка помогает визуализировать частицы, она также стабилизирует наночастицы железа, которые иначе бы были неустойчивы к окислению на воздухе. Подобный композит был синтезирован методом обратных мицелл в бромиде цетилтриметиламмония. Полученные частицы имели диаметр 10–15 нм, обладали большой магнитной анизотропией, а их удельное поглощение почти вдвое превышает удельное поглощение обычных наночастиц оксида железа. Частицы можно доставлять в опухоли тремя путями: напрямую вводить через шприц, либо с помощью антител против специфических антигенов опухоли, либо направлять в опухолевый очаг, либо используя внешний магнит.

Наночастицы оксида железа нужно нагреть до температуры на 6 градусов выше, чем температура человеческого тела. Это приводит раковые клетки в состояние «шока» и последующей гибели. Нагревание достигается переменным магнитным полем. Здоровые клетки, где нет наночастиц, остаются интактными.

В гипертермии помимо чистого магнетита, также применяют наночастицы магнетита с добавлением ионов гадолиния [14] за счет чего достигается увеличение в скорости специфического поглощения энергии, а следовательно КПД процесса в целом, а также феррита кобальта – CoFe_2O_4 [21].

Литература

1. Беленков Ю.Н., Терновой С.К., Сеницын В.Е. Магнитно-резонансная томография сердца и сосудов. – М.: Видар, 1997. – 144 с.
2. Березин С.М., Тютин Л.А., Яковлева Е.К. и др. Контрастная магнитно-резонансная вено-портотография при заболеваниях печени // Мед визуализация. – 1999. – № 2. – С. 37–40.
3. Ваишман А.А., Пронин И.С. Ядерная магнитная релаксационная спектроскопия. – М.: Энергоатомиздат, 1986. – 231 с.

Имеются сообщения об использовании метода «магнито-жидкостной гипертермии» для терапии глиобластомы [16]. Метод состоит в том, что в опухолевую ткань с помощью направленного транспорта или под наркозом вводится жидкость, содержащая наночастицы оксида железа. Затем опухоль подвергается воздействию внешнего магнитного поля, в результате чего наночастицы железа нагреваются до температуры 45 °С. Такой нагрев разрушает опухолевую ткань и одновременно усиливает эффективность последующей лучевой терапии. Однако лечение эффективно пока лишь на ранних стадиях заболевания. Возможно также использование железа в виде нанопрошка Fe_2C (размер частиц 25 нм, содержание железа 99,99 %, углеродная пленка толщиной 5 нм) после его включения в хитозановые капсулы вместе с карбоплатином (размер 207 нм) для магнитной гипертермической терапии опухоли печени [20]. При этом опухоль нагревалась до 42,6 °С в течение 10 мин, а в другой доле печени без опухоли температура была на 2–3 градуса ниже. Подавление роста опухоли в результате такой комплексной ХТ и магнитной гипертермии было значительным.

Таким образом, нанотехнологии с использованием железа позволяют получать эффективные препараты для магнитной гипертермической терапии различных опухолей.

Заключение

Использование магнитных наночастиц на основе сложных оксидов железа в онкологии весьма перспективно. Наночастицы оксида железа благодаря своим магнитным свойствам могут стать инструментом как для визуализации, так и для лечения этих новообразований.

Это значит, что существует шанс в течение следующего десятилетия получить недорогой метод лечения рака с более высокой вероятностью успеха, чем может гарантировать химиотерапия. Раковые клетки не могут развить резистентность к физическим методам. Они могут стать резистентными к химиотерапии, но не могут противостоять вызывающему их гибель нагреванию.

Наночастицы сложного оксида железа магнетита – Fe_3O_4 являются наиболее подходящими магнитными материалами для биомедицинских исследований. С его помощью можно создавать препараты для контрастирования, разрабатывать методики лечения онкологических больных методом магнитной термотерапии. Движением таких наночастиц можно управлять посредством наложения внешнего магнитного поля и локализовать их в необходимой области или органе.

Это касается как процесса доведения лекарственного препарата до определенного органа, так и удержания его в этом органе. Перспективность применения сложного оксида железа определяется возможностью создания на его основе стабильной коллоидной системы и наличием значительного пула элемента железа в крови человека.

4. Гранов А.М., Тютин Л.А., Березин С.М. Применение магнитно-резонансной томографии в хирургической гепатологии // Вестн. рентг. и радиол. – 2002. – № 3. – С. 32–7.
5. Коновалов А.Н., Корниенко В.Н., Пронин И.Н. Магнитно-резонансная томография в нейрохирургии. – М.: Видар, 1997. – 471 с.
6. Корниенко В.Н., Пронин И.Н., Арутюнов Н.В. и др. МР-ангиография с применением нового одномолярного контрастного препарата гадовист 1,0 в нейрохирургической клинике // Мед. визуализация. – 2004. – №1 – С. 16–25.
7. Магневист в клинической практике/ мат. симпозиума // Вестник рентгенологии и радиологии – 1994. – № 2. – С. 4–48.
8. Медицинская визуализация // Материалы Всероссийского конгресса Радиология-2010, Специальный выпуск.
9. Терновой С.К., Синицын В.Е., Морозов С.П. Современная магнитно-резонансная томография. – М.: Кремлевская медицина, 2007. – 3. – С. 67–70.
10. Тютин Л.А., Шимановский Н.Л., Трофимова Т.Н. 15 лет клинического применения «магневиста» - первого магнитно-резонансного контрастного средства // Мед. визуализация. – 2004. – № 3. – С. 125–34.
11. Шимановский Н.Л. Контрастные средства. Руководство по рациональному применению. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2009. – 464 с.
12. Шимановский Н.Л., Епинетов М.А., Мельников М.Я. Молекулярная и нанофармакология. – М.: Наука, 2010. – 624 с.
13. Boos M., Lentschig M., Scheffler K. et al. Contrast-enhanced magnetic resonance angiography of peripheral vessels. Different contrast agent applications and sequence strategies: a review // Invest Radiol. – 1998. – 33. – P. 538–46.
14. Drake P., Cho H.J., Shih P.S. et al. Gd-doped iron-oxide nanoparticles for tumor therapy via magnetic field hyperthermia // J. Mater. Chem. – 2007. – 17. – P. 4914–8.
15. Felix R., Heshiki A., Hricak H. Magnevist. – Monograph 4th edd. – Berlin: Blackwell Science, 2001. – 242 p.
16. Hadjipanayis C.G., Machaidze R., Kaluzova M. et al. EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma // Cancer Res. – 2010 – 70(15). – P. 6303–12.
17. Ho V.B., Choyke P.L., Foo T.K. et al. Automated bolus chase peripheral MR angiography: initial practical experiences and future directions of this work-in-progress // J Magn Reson Imaging. – 1999. – 10. – P. 376–88.
18. Kalambur V.S., Longmire E.K. Cellular Level Loading and heating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles // Langmuir – 2007. – 23. – P. 12329–36.
19. Leiner T., Ho K.Y., Nelemans P.J. et al. Three-dimensional contrast-enhanced moving-bed infusion-tracking (MoBI-track) peripheral MR angiography with flexible choice of imaging parameters for each field of view // J Magn Reson Imaging. – 2000. – 11. – P. 368–77.
20. Li F.R., Yan W.H., Guo Y.H. et al. Preparation of carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles and study on hyperthermia combined with pharmacotherapy for liver cancer // Int J Hyperthermia. – 2009. – 25. – P. 383–91.
21. Skumiel A. Suitability of water based magnetic fluid with CoFe₂O₄ particles in hyperthermia // JMMM. – 2006. – 307 – P. 85–90.
22. Vilarino-Varela M.J., Taylor A., Rockall A.G. et al. A verification study of proposed pelvic lymph node localisation guidelines using nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging // Radiother Oncol. – 2008. – 89(2). – P. 192–6.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 618616.24-006.6-08-059:615.831/849

*Ю.А. Рагулин, М.А. Каплан, В.Н. Медведев, Н.В. Афанасова, В.Н. Капинус***СОЧЕТАННАЯ ФДТ И ЛТ В ЛЕЧЕНИИ РАКА ЛЕГКОГО***МРНЦ, Обнинск***Контактная информация***Юрий Александрович Рагулин, канд. мед. наук, старший научный сотрудник отделения лучевого и хирургического лечения заболеваний торакальной области***адрес:** 249036, Калужская обл., г. Обнинск, ул. Королева 4, клиника 1 МРНЦ; тел. +7(48439)93148;**моб.** +79056418780; **факс** +74843993211**e-mail:** yuri.ragulin@mail.ru

Статья поступила: 16.01.2011, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Цель работы – оценка возможности комбинирования фотодинамической и лучевой терапии у больных раком легкого для улучшения непосредственных результатов лечения. В исследование включено 57 больных, имевших обтурационные вентиляционные нарушения, обусловленные опухолевым стенозом главного или долевого бронха, которые получили лучевое и химиолучевое лечение. 28 больным перед лучевой (или химиолучевой) терапией проводилась ФДТ с целью реканализации бронха и восстановления пневматизации легочной ткани, 29 больных составили контрольную группу. В исследовании показана высокая клиническая эффективность ФДТ и безопасность ее использования. Проведение ФДТ перед лучевой терапией у больных с опухолевым стенозом крупных бронхов позволяет добиться выраженного положительного эффекта, заключающегося в ликвидации ателектаза и устранении гиповентиляции (у 85,7 больных против 62,1 % положительного эффекта у пациентов, получающих только лучевую терапию).

Ключевые слова: рак легкого, фотодинамическая терапия, лучевая терапия.*Yu.A. Ragulin, M.A. Kaplan, V.N. Medvedev, N.V. Afanasova, V.N. Kapinus.***COMBINED PHOTODYNAMIC THERAPY AND RADIOTHERAPY IN PATIENTS WITH LUNG CANCER***Medical Radiological Research Center, Obninsk***Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of photodynamic therapy (PDT) and radiotherapy combination in lung cancer patients in order to improve the direct results of treatment. 57 patients who had ventilation disorders caused by tumor stenosis of the main or lobar bronchus were enrolled in this study. This group of patients has received radiotherapy and chemoradiotherapy. 28 patients were treated PDT to bronchial recanalization and recovery pneumatization of lung tissue before radiotherapy, 29 patients were included in control group. The study demonstrated high clinical efficacy of PDT and safety of its use. PDT before radiotherapy in patients with tumor bronchial obstruction was more effective, then in patients who receive radiotherapy alone. Atelectasis resolution and altered ventilation elimination was observed in 85,7 % and 62,1 % cases, respectively.

Key words: lung cancer, photodynamic therapy, radiotherapy.**Введение**

В настоящее время в большинстве развитых стран рак легкого является наиболее распространенной формой опухоли у мужчин и одной из важнейших медицинских и социально-экономических проблем. Очень малое различие в среднем возрасте заболевших и умерших является следствием неблагоприятного прогноза при этой форме опухоли, характеризующейся высокой одногодичной летальностью. Наиболее радикальным методом лечения НМРЛ считается хирургическое лечение.

Однако только 15–30 % больных являются операбельными на момент постановки диагноза. Использование методик консервативного лечения в настоящее время не позволяет добиться удовлетворительных результатов и может ограничиваться распространенностью процесса, осложнениями и сопутствующей патологией [6].

Поэтому необходима разработка и внедрение новых методов, позволяющих увеличивать число больных раком легкого, которым может быть проведено лучевое, лекарственное и комбинированное лечение. С 1980-х гг. в торакальной онкологии стала применяться ФДТ.

Метод ФДТ основан на способности экзогенных фотосенсибилизаторов избирательно накапливаться в тканях злокачественной опухоли и под действием света или лазерного излучения вызывать фотохимические реакции, приводящие к разрушению раковых клеток.

Основную роль в механизме противоопухолевого воздействия играют фотохимические реакции с образованием синглетного кислорода, повреждающего клеточные мембраны. Фототоксический эффект усиливается благодаря нарушению кровообращения опухоли при повреждении эндотелия сосудов опухоли и цитокиновым реакциям [7; 19].

Преимуществами данного метода лечения являются избирательность поражения опухоли и возможность многократного повторения лечебной процедуры [4; 7; 8]. Прогрессивное использование эндоскопических хирургических технологий расширило спектр показаний к ФДТ в онкопульмонологии как при изолированном применении, так и с другими методами эндобронхиального воздействия [5]. Наилучшие успехи достигнуты при лечении ранних форм центрального рака легкого, позволив считать метод альтернативой хирургии и лучевой терапии. Использование фотодинамической терапии оказывает симптоматическую и паллиативную помощь больным, признанным инкурабельными. В случаях выраженной дыхательной недостаточности, обусловленной обтурационными вентиляционными нарушениями, ФДТ способствует их разрешению и создает возможность проведения лучевой и химиотерапии.

Основным направлением развития данного метода является определение места и показаний к ФДТ в схемах лечения рака легкого [10; 15]. Другой перспективой является разработка и внедрение новых фотосенсибилизаторов [1; 2; 16]. У каждого из основных, применяемых при лечении рака легкого методов, есть свои достоинства и недостатки. Обычно комбинирование двух или трех методов ведет к увеличению вероятности излечения опухоли. При этом удается потенцировать преимущества обоих методов и минимизировать их недостатки. Так, ФДТ обладает высокоэффективным местным действием, но недостаточно воздействует на микрометастазы в нормальной ткани и региональных коллекторах. Лучевая терапия, наоборот, достаточно эффективно воздействует на микрометастазы, но в то же время, в ряде случаев, не достигает полного эффекта при воздействии на саму опухоль. Учитывая все вышеизложенное, представляется возможным и весьма перспективным сочетание лучевой терапии и ФДТ.

При этом предварительное проведение ФДТ больным с эндобронхиальной опухолевой обструкцией способно улучшить результаты лучевой терапии путем реализации следующих механизмов:

- прямой цитотоксический эффект приводит к уменьшению объема опухолевой ткани, а, следовательно, способен увеличить эффективность ЛТ [9; 12];
- восстановление проходимости бронхиального дерева снижает риск развития гнойно-воспалительных осложнений в легком, в том числе в процессе проведения лучевой терапии [14];
- восстановление пневматизации легочной ткани и следующее за этим восстановление микроциркуляции способно уменьшить выраженность постлучевых фиброзных изменений [13; 17];
- уменьшение изнуряющих симптомов: одышки, кашля и кровохарканья облегчает состояние больного, а в некоторых случаях открывает возможность для дальнейшего лечения (перевод из инкурабельного состояния в курабельное) [18];
- создает возможность более точного формирования полей облучения при дозиметрическом планировании после восстановления анатомических структур.

В значительной степени указанные моменты относятся и к химиотерапии. В настоящее время в мире существуют работы как экспериментального,

так и клинического характера, затрагивающие поднятую тему [3; 11]. S. Lam et al. сообщили о сравнении эффективности лучевой терапии и сочетанной лучевой терапии и ФДТ при раке легкого. В рандомизированную группу их исследования входил 41 больной.

Обструкция дыхательных путей разрешилась после сочетанного применения лучевой и фотодинамической терапии у 70 % больных, в то время как проходимость дыхательных путей восстановилась лишь у 10 % пациентов, получивших только лучевую терапию [11].

К сожалению, количество клинических работ о возможности сочетания ФДТ с другими методами консервативной терапии невелико и в настоящее время не позволяет сделать достоверных выводов о целесообразности комбинирования [15].

Целью данной работы являлась оценка возможности комбинирования фотодинамической и лучевой терапии у больных раком легкого для улучшения непосредственных результатов лечения.

Материалы и методы

В исследование включено 57 больных с морфологически верифицированным немелкоклеточным раком легкого, которые в 2003–2009 гг. получали лучевое и химиолучевое лечение в клинике МРНЦ.

Все больные имели обтурационные вентиляционные нарушения, обусловленные опухолевым стенозом главного или долевого бронха. 28 больных перед лучевой (или химиолучевой) терапией проводилась ФДТ с целью реканализации бронха и восстановления пневматизации легочной ткани, 29 больных составили контрольную группу. Группы пациентов были сопоставимы по стадиям заболевания, морфологическим вариантам, возрастным характеристикам и полу.

Всем больным проводилась лучевая терапия по методике дробления дневной дозы 2,5 Гр на две фракции 1 Гр и 1,5 Гр с интервалом 4–5 ч. ФДТ с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда (фотолон, фотодитазин) проводили за 10–14 дней до начала лучевой терапии. По 10 больных из каждой группы получали одновременную химиотерапию по схеме цисплатин+этопозид или карбоплатин+паклитаксел.

Эффективность ФДТ оценивали по степени восстановления пневматизации легочной ткани, определяемой рентгенологически. Обзорная рентгенография органов грудной полости в прямой и боковой проекциях производилась на рентгеновской установке ТУР Д 800-4, цифровая обработка рентгенограмм осуществлялась на установке «Комплекс АДС».

Результаты и обсуждение

Основными типами вентиляционных нарушений, которые развиваются в легком в результате опухолевой обструкции бронхов, являются ателектаз и гиповентиляция, исходные вентиляционные нарушения в ходе исследования были классифицированы следующим образом:

1. Ателектаз доли или легкого.
2. Субателектаз доли (ателектаз сегментов + гиповентиляция доли).
3. Гиповентиляция (доли или сегмента).

Таблица 1

Частота вентиляционных нарушений у больных в изучаемых группах до лечения

Группа	Ателектаз (%)	Субателектаз (%)	Гиповентиляция (%)
1. ЛТ+ФДТ (28 больных)	10 (35,7 %)	12 (42,9 %)	6 (21,4 %)
2. ЛТ (29 больных)	10 (34,5 %)	12 (41,4 %)	7 (24,1 %)

Таблица 2

Рентгенологическая динамика после проведенного лечения

№	Лечение	п больных	Положительная динамика		Без эффекта	Отрицательная динамика
			Выраженная	Слабая		
1.	ЛТ+ФДТ	28	20 (71,4 %)	4 (14,3 %)	4 (14,3 %)	–
2.	ЛТ	29	14 (48,3 %)	4 (13,8 %)	9 (31 %)	2
Всего		57	35	9	11	2

Частота вентиляционных нарушений у больных в исследуемых группах была сопоставима по степени их выраженности (табл. 1). Контрольное рентгенологическое исследование выполнялось при достижении СОД-50–55 Гр. Динамику со стороны вентиляционных нарушений оценивали следующим образом:

1. Положительная
 - выраженная (разрешение ателектаза, полное восстановление пневматизации при субателектазе и гиповентиляции);
 - слабая (уменьшение вентиляционных нарушений);
2. Отсутствие рентгенологической динамики;
3. Отрицательная (нарастание вентиляционных нарушений).

Как видно из табл. 2, положительная рентгенологическая динамика была достигнута у большего числа пациентов, получавших лучевую терапию с ФДТ по сравнению с таковыми контрольной группы. Разрешение ателектаза (рис. 1) с полным восстановлением пневматизации наблюдалось у 5 больных из 10 (50 %) группы ФДТ+ЛТ, в то время как в контрольной группе данное событие отмечено лишь в 2 случаях из 10 (20 %). Отсутствие эффекта и отрицательная динамика были зафиксированы у 11 (37,9 %) больных группы №2, а в группе №1 лишь у 4 (14,3 %). Осложнения (пневмонии) наблюдались у 4 (14,3 %) больных в группе ЛТ+ФДТ и у 2 (6,9 %) в контрольной группе. Однако при анализе частоты осложнений в группе ЛТ+ФДТ отмечено, что у 16 пациентов, которые сразу после ФДТ получали антибактериальную терапию, пневмония развилась только в одном случае (6,3 %), что наряду с данными получаемыми нами при использовании ФДТ у других групп больных раком легкого позволило сделать вывод о необходимости использования антибиотиков широкого спектра действия в профилактических целях сразу после эндоскопической процедуры.

У всех больных введение фотосенсибилизатора протекало без побочных реакций, и переносимость этих фармпрепаратов была удовлетворительной. Проявлений кожной фототоксичности при соблюдении светового режима в течение 3 суток после ФДТ не наблюдали.

У 7 (25 %) больных, получивших ФДТ при бронхоскопии, через 5–7 дней отмечался поверхно-

стный, у 21 (75 %) – глубокий некроз опухоли. При этом же исследовании, выполненном через месяц после ФДТ, у 18 (64,3 %) выявлена полная регрессия экзофитного компонента опухоли (рис. 2.), у 10 (35,7 %) отмечена частичная регрессия опухолевого очага. К настоящему времени зависимости степени изменения вентиляционных нарушений от степени регрессии экзофитного компонента опухоли не выявлено. У 81,3 % больных основной группы клинически реализация эффекта фотодинамической терапии проявлялась в полном прекращении кровохарканья, у 53,8 % больных – в уменьшении кашля, у 50 % больных – в уменьшении одышки. Спирометрия до и после процедуры

ФДТ проводилась 14 больным исследуемой группы. У 4 больных с опухолевым стенозом главного бронха увеличение жизненной емкости легких после процедуры ФДТ составляло от 6 до 27 % (в среднем 16 %), у 8 больных при обтурации долевого бронха от 3 до 9 % (в среднем 6 %). Выраженный симптоматический эффект в значительной степени позволял улучшить состояние больных и начинать лучевую терапию при их лучших условиях. Следует отметить, что в основную группу было включено 4 больных, которым до ФДТ не планировалось проведения лучевой терапии в связи с тяжелым состоянием и кровохарканьем.

Однако после ФДТ их состояние было стабилизировано, устранены противопоказания к лучевой терапии, которая впоследствии была проведена по соответствующим программам.

Выводы

Фотодинамическая терапия с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда удовлетворительно переносится, обладает выраженной клинической эффективностью.

Использование ФДТ перед лучевой терапией у больных с опухолевым стенозом крупных бронхов позволяет добиться выраженного положительного эффекта, заключающегося в ликвидации ателектаза и устранении гиповентиляции, у 85,7 % больных против 62,1 % положительного эффекта у больных, получающих только лучевую терапию.

Частоту воспалительных осложнений позволяет снизить назначение антибактериальных препаратов непосредственно после эндоскопической манипуляции.

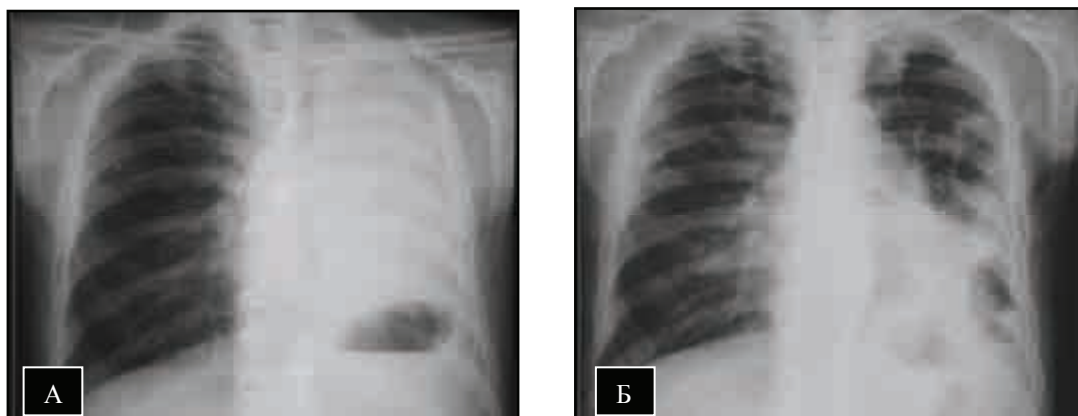


Рис. 1. Центральный рак левого легкого. Обзорная рентгенограмма органов грудной клетки:

А: до лечения, ателектаз левого легкого;

Б: через 3 недели после ФДТ, восстановление воздушности левого легкого.

(рис. 2. см. на вклейке)

Литература

1. Гельфонд М.Л., Барчук А.С., Васильев Д.Т., Стуков А.Н. Возможности фотодинамической терапии в онкологической практике // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 67–71.
2. Рагулин Ю.А., Каплан М.А., Медведев В.Н. и др. Фотодинамическая терапия как метод улучшения результатов лечения рака легкого // Альманах клинической медицины. – 2008. – Том XVII, Часть 2. – С. 238–41.
3. Спиченкова И.С., Каплан М.А., Гулидов И.А. и др. Сочетанная фотодинамическая и рентгенотерапия саркомы М–1 у крыс // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – № 3. – С. 62–8.
4. Странадоко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // Лазерная медицина. – 2002. – Т.6, вып. 1. – С. 4–8.
5. Соколов В.В., Телегина Л.В., Осипова Н.А. и др. Оптимальные варианты эндотрахеальной-эндоbronхальной хирургии и терапии при злокачественных опухолях трахеи и бронхов // Вестник Московского онкологического общества. – 2006. – № 2. – С. 7–8.
6. Трахтенберг А.Х., Чиссов В.И. Рак легкого: руководство, атлас. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 656 с.
7. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. ФДТ. – М.: МИА, 2009. – 192 с.
8. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. и др. Современные возможности и перспективы эндоскопической хирургии и фотодинамической терапии злокачественных опухолей // Российский онкологический журнал. – 1998. – № 4. – С. 4–12.
9. Banerjee A., George J. Bronchoscopic photodynamic diagnosis and therapy for lung cancer // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2000. – 6. – P. 378–83.
10. Harrod-Kim P. Tumor ablation with photodynamic therapy: introduction to mechanism and clinical applications // J. Vasc. Interv. Radiol. – 2006. – 11. – P. 1441–8.
11. Lam S., Grafton C., Coy P. et al. Combined photodynamic therapy (PDT) using photofrin and radiotherapy (XRT) versus radiotherapy alone in patients with inoperable obstructive non-small cell bronchogenic carcinoma // SPIE. – 1994. – 1616. – P. 20–8.
12. Lam S., Haussinger K., Leroy M. et al. Photodynamic therapy (PDT) with photofrin®, a treatment with curative potential for early-stage superficial lung cancer [abstract] // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. – 1998. – 17. – Abstract 1781.
13. Makimoto T., Tsuchiya S., Hayakawa K. et al. Risk factors for severe radiation pneumonitis in lung cancer // Jpn. J. Clin. Oncol. – 1999. – 29. – P. 192–7.
14. Ono R., Egawa S., Ikeda S. Combined treatment of endoscopic laser irradiation and radiotherapy in lung cancer // Gan. To Kagaku Ryoho. – 1989. – 16. – P. 1418–24.
15. Ost D. Photodynamic Therapy in Lung Cancer // Oncology. – 2000. – 14(3). – P. 379–91.
16. Pass H.I. Photodynamic Therapy for palliation of locally advanced lung cancer // Oncology. – 1999. – 13(5). – P. 608–13.
17. Rancati T., Ceresoli G.L., Gagliardi G. et al. Factors predicting radiation pneumonitis in lung cancer patients: a retrospective study // Radiother. Oncol. – 2003. – 67. – P. 275–83.
18. Wieman T.J., Diaz-Jimenez J.P., Moghissi K. et al. Photodynamic therapy (PDT) with photofrin® is effective in the palliation of obstructive endobronchial lung cancer: Results of two randomized trials // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. – 1998. – 17. – 464a. – Abstract 1782.
19. Wieman T.J., Mang T.S., Fingar V.S. et al. Effects of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels // Surgery. – 1988. – 104. – P. 512–7.

УДК 576.385.5:616-092.9-033.2:577.112

Я.А. Каинов, И.А. Фаворская, Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова, А.В. Комельков, Е.М. Чевкина

РОЛЬ БЕЛКА CRABP1 В ФОРМИРОВАНИИ ВЫСОКОМЕТАСТАЗНОГО ФЕНОТИПА RSV-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ СИРИЙСКОГО ХОМЯКА

РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация

Чевкина Елена Максимовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)324-17-64;

e-mail: tchevkina@mail.ru

Статья поступила: 16.01.2011, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Работа посвящена исследованию значения белка, связывающего ретиноевую кислоту (CRABP1) в регуляции метастатической активности трансформированных клеток *in vivo*. До настоящего времени в литературе отсутствовали экспериментальные данные об участии CRABP1 в регуляции процессов метастазирования и стимуляции опухолевой прогрессии. В данной работе на модельной системе впервые показана корреляция между экспрессией данного белка и уровнем спонтанной метастатической активности трансформированных клеток. Также впервые показано, что суперэкспрессия белка CRABP1 в низкометастатической клеточной линии приводит к увеличению, а подавление экспрессии в высокометастатической линии – к значительному снижению туморогенности и метастатической активности клеток.

Ключевые слова: опухолевая прогрессия, метастазирование, СМА, туморогенность, CRABP1, малые шпилечные РНК.

Ya.A. Kainov, I.A. Favorskaya, E.E. Antoshina, T.G. Gor'kova, A.V. Komelkov, E.M. Chevkina

CRABP1 PARTICIPATES IN THE PROGRESSION OF SYRIAN HAMSTER RSV-TRANSFORMED FIBROBLASTS TO MORE AGGRESSIVE PHENOTYPE

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

Abstract

In this study we have examined the role of CRABP1 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) in the regulation of transformed fibroblasts metastatic activity *in vivo*. Up to date there are no experimental evidence on CRABP1 participation in metastasis stimulation and tumor progression. In present study manufactured on the animal model system we first have shown the correlation between expression of CRABP1 protein and the level of transformed cells metastatic activity. We have also shown that CRABP1 overexpression increased the tumorigenicity and metastatic activity while CRABP1 suppression in high-metastatic cell line results in significant reduction of mentioned above cells properties.

Key words: Tumor progression, metastasis, SMA, tumorigenicity, CRABP1, shRNA.

Введение

Причиной большинства летальных исходов при злокачественных заболеваниях является не сама первичная опухоль, а формирование метастазов и генерализация опухолевого процесса. Несмотря на появление новых методов диагностики, многие опухоли часто обнаруживают уже в ходе процесса метастазирования. Очевидно, что предотвратить это клинически значимое явление невозможно без понимания базовых механизмов, определяющих процесс метастазирования на молекулярном и клеточном уровнях.

Процессы, приводящие к формированию метастатического фенотипа трансформированных клеток, очень разнообразны и одновременно взаимосвязаны. Они затрагивают самые разные аспекты клеточной жизнедеятельности. Несмотря на достижения последних лет, касающиеся роли отдельных белков и внутриклеточных сигнальных каскадов, картина событий, происходящих в процессе малигнизации, достаточно противоречива и фрагментарна.

Идентификация и функциональный анализ ключевых белков и сигнальных каскадов, задействованных в регуляции опухолевой прогрессии и мета-

стазирования, безусловно, является одной из важнейших фундаментальных задач молекулярной биологии и экспериментальной онкологии.

Работа посвящена исследованию роли белка CRABP1 в формировании метастатического фенотипа опухолевых клеток. CRABP1 – белок с молекулярной массой 15,5 кДа, специфически связывающий ретиноевую кислоту. Хорошо известно, что ретиноевая кислота играет важную роль в процессах эмбриогенеза и способна стимулировать дифференцировку широкого спектра клеток различного гистогенеза. Несмотря на то, что CRABP1 локализуется преимущественно в цитоплазме, он способен проникать в ядро, т.к. несет в своей структуре последовательность ядерной локализации [3], а также обнаруживается в митохондриях [11] и перинуклеарном пространстве [8]. Основной функцией данного белка является негативная регуляция внутриклеточной концентрации РК посредством усиления ее ферментативной деградации или же секвестрирования в цитоплазме.

CRABP1 экспрессируется в широком спектре нормальных тканей организма. Но при этом везде, за исключением сетчатки глаза, уровень его экспрессии достаточно низок.

Несмотря на то, что изменение экспрессии CRABP1 характерно для гемобластозов и солидных опухолей различного происхождения, его участие в процессах канцерогенеза крайне слабо охарактеризовано. Имеющиеся данные противоречивы и свидетельствуют о двойственной роли CRABP1. Некоторые из них позволяют судить о схожести его функций с близкородственным белком CRABP2, т.к. повышенная экспрессия CRABP1, как и CRABP2, в клеточных линиях и тканях экспериментальных животных приводит к усилению эффекта ПК [4; 14]. Результаты других исследований свидетельствуют о негативной регуляции ПК CRABP1, в частности – об активном усилении катаболизма ПК и нивелировании ее эффекта в присутствии CRABP1 [1; 2]. Эта неоднозначная ситуация, а также обнаружение изменения экспрессии данного белка при различных онкозаболеваниях, делают исследования CRABP1 в контексте канцерогенеза чрезвычайно актуальными. Литературные данные о роли этого белка в процессе метастазирования на сегодняшний день отсутствуют. В данной работе впервые показано влияние экспрессии CRABP1 на усиление туморогенности и спонтанной метастатической активности трансформированных клеток *in vivo*.

Материалы и методы

Культивирование клеток Трансфекция

В качестве экспериментальной модели для данного исследования использовались эмбриональные фибробласты сирийского хомяка (*Mesocricetus auratus*), трансформированные вирусом саркомы Рауса штамма Шмидт-Руппин D: HET-SR, HET-SR-1, HET-SR-8 и HET-SR-25C (рис. 1А). Для получения ретро- и лентивирусных частиц использовались линии эпителиальных клеток GP293 (Clontech, Япония) и 293FT (Invitrogen, США) (производные линии HEK-293 – линии эмбриональных клеток почки человека). Все эукариотические линии культивировались в CO₂-инкубаторе (при 37 °C, в атмосфере 5 %-ного CO₂). В качестве среды для культивирования использовалась DMEM с добавлением 0,294 мг/мл L-глутамина и 10 %-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (PAA Laboratories, Австрия), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина. Подсчет клеток производился с помощью камеры Горяева.

Для получения псевдоретровирусных частиц клетки GP293 наращивались до 70 %-ной конfluентности. Для трансфекции брали 2 мкг ДНК – ретровирусный вектор pLXSN (Clontech, Япония) с целевым геном и плазмиду pVSV-G (Clontech, Япония), кодирующую белок оболочки вируса везикулярного стоматита, необходимый для сборки вируса и увеличения тропности вирусных частиц к клеткам хомяка. Плазмиды смешивались в эквимольном соотношении. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина 2000 (Lipofectamine 2000™ Reagent, Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Среду собирали через 24; 48 и 72 часа, центрифугировали 10 мин при 1500 g для удаления клеточного дебриса и использовали для инфекции. Для получения псевдолентивирусных частиц использовали клеточную линию 293FT. Для трансфекции брали 2 мкг плазмидной ДНК – лентивирусный вектор pLKO.1 puro (Addgene, США), несущий последовательность малой шпилечной РНК, pVSV-G и пакующую плазмиду pDeltaR8.2, кодирующую вирусные белки, в эквимольном соотношении. В остальном процедура трансфекции не отличалась от таковой в случае GP-293.

Инфекция псевдовирусными частицами

Среду клеткам-мишеням заменяли на смесь вирусного супернатанта и обычной среды в соотношении 1:1 с добавлением полибрана (Sigma, США) до конечной концентрации 8 мкг/мл. Использовались 24, 48 и 72-часовые инокуляты вируса. Для контроля селекции рассевали неинфицированные клетки. В случае ретровирусной инфекции селекция проводилась на G418 (1200 мкг/мл, Sigma, США) в течение 8–9 дней. В случае лентивирусной инфекции отбор проводился с добавлением пуромицина (4,5 мкг/мл, Sigma, США) в течение 5 дней. Для дальнейших экспериментов использовали свежеразмороженные аликвоты полученных клеточных линий.

Выделение РНК, ОТ-ПЦР

Выделение РНК из клеточных линий проводилось с использованием реагента Trizol (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Для получения одноцепочечных кДНК в реакцию брали 2 мкг суммарной РНК, предварительно обработанной ДНК-азой I, согласно протоколу производителя (1ед на 1 мкг РНК) (Fermentas, Канада). В качестве затравки использовали праймер random9. Обратную транскрипцию проводили с использованием ревертазы M-MLV (Promega, США).

В работе использовались следующие праймеры: CRABP1 F – 5'GCAGCGAGAATTTTCGACGAG3', CRABP1 R – 5'TCCGACCTTGAAGTTGATCT3', RPLP0 F – 5' GGGCGACCTGGAAGTCCAAC3', RPLP0 R – 5'GTTCTTGCCCATCAGACCCAC3'.

Праймеры на рибосомальный белок RPLP0, являющийся геном «домашнего хозяйства», использовали для выравнивания кДНК. Поскольку геном сирийского хомяка не секвенирован, праймеры подбирали на консервативные последовательности исследуемых мРНК человека, крысы и мыши. Выравнивание мРНК и подбор праймеров осуществляли в программе VectorNTI (Invitrogen, США). Температура отжига коротких праймеров рассчитывалась по стандартной методике: +4 °C для G– и C– нуклеотидов, и 2 °C для A– и T– нуклеотидов. Количество циклов, при котором происходила амплификация каждого из фрагментов, подбирали экспериментально.

Иммуноблоттинг

Клеточные лизаты получали из субконфлюентного монослоя клеток с использованием буфера RIPA, содержащего смесь ингибиторов протеаз (25× protease cocktail inhibitor, Roche, Швейцария). Полученные лизаты нормализовали по количеству белка, используя метод Бредфорд, на гель наносили 20 мкг белка.

Белки разделяли в 15% SDS-полиакриламидном геле, после чего переносили на PVDF мембрану (Millipore, США) методом мокрого переноса по стандартному протоколу (прибор Mini Trans-Blot, Bio-Rad Laboratories Inc., США). Мембрану инкубировали в 0,5%-ном p-ре молока (Bio-Rad Laboratories Inc., США) в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали в течение 10 ч с соответствующими первичными антителами при +4 °C, с последующей стандартной отмывкой. После чего мембрану 1–1,5 часа при комнатной температуре инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После стандартной отмывки мембрану проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Millipore, США). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе Kodak GelLogic 2200 Imaging system с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27.

Для идентификации белка CRABP1 использовались антитела anti-CRABP1 ab2816 (Abcam, Великобритания), в качестве контроля использовали антитела к в-актину ab8227 (Abcam, Великобритания).

Получение экспрессирующих векторов

Кодирующая последовательность мРНК CRABP1 хомяка была клонирована в ретровирусный вектор pLXSN по сайтам XhoI и BamHI. Для этого использовали праймеры, подобранные на консенсусные последовательности, фланкирующие кодирующую область мРНК CRABP1 у мыши и крысы:

– CRABP1 cloning F
– 5'TATCTCGAGACCATGCCCAACTTC3'
и CRABP1 cloning R
– 5'TAAGGATCCGGCCACCTTTACTCC3'

(рестриктивные сайты выделены курсивом, части, комплементарные мРНК, подчеркнуты). В качестве матрицы для ПЦР использовали кДНК из линии HET-SR-1, т.к. мРНК CRABP1 экспрессируется там на высоком уровне.

shA 5' TCTATATCAAGACATCCACCACTCGAGTGGTGGATGTCTTGATATAGATTTTTTG3',
ShB 5' CGGACGCAAGTGCAGGAGTTTCTCGAGAACTCCTGCACCTTGGCTCCGTTTTTG 3',
shC 5' CACAAGAATTTATGTCCGGGACTCGAGTCCCGGACATAAATTCCTTGTTTTTG 3'

(смысловая и антисмысловая последовательности подчеркнуты). Для клонирования каждого конструктора синтезировали олигонуклеотиды (F и R для каждой конструкции), модифицированные липкими концами для соответствующих рестриктивных сайтов. Полученные конструкции проверялись секвенированием.

Анализ туморогенности

Суспензия клеток прививалась подкожно по 4 дозы каждому животному: 2×10^1 , 2×10^2 , 2×10^3 и 2×10^4 клеток соответственно.

В эксперименте использовалось по 10 животных в группе, которой прививались клетки каждой линии.

Оценка прививаемости проводилась по прошествии 45 дней после инъекции клеток. Каждый эксперимент проводился в трех независимых повторях.

Анализ спонтанной метастатической активности

Суспензия клеток в количестве 2×10^4 вводилась подкожно 10 экспериментальным животным. По прошествии 60 дней с момента инъекции животных усыпляли и проводили подсчет метастазов в легких (рис. 1Б).

Легкие фиксировали в спиртовом растворе формалина (10 %-ный формалин и 63 %-ный этанол), после чего получали парафиновые блоки, с которых готовили серийные ультратонкие срезы на стеклах. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином. Количество метастатических узлов верифицировали гистологически. Каждый эксперимент проводился в трех независимых повторях.

Статистическая обработка результатов

Все эксперименты выполнялись в трех независимых повторях.

Для определения значимых различий по СМА и туморогенности в случае сравнения двух выборок применялся двухсторонний критерий Манна-Уитни. Расчеты производились с помощью программы GraphPad Prism ver. 5.02.

Аmplификацию проводили в присутствии высокоточной полимеразы PFX (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Очистку продукта ПЦР и выделение рестриктивных фрагментов из агарозного геля проводили с использованием QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Для секвенирования использовали праймер:

pLXSN F – 5'CTTTATCCAGCCCTCAC3'.

Поскольку кодирующая последовательность мРНК CRABP1 сирийского хомяка была неизвестна, все манипуляции проводили в двух независимых повторях и осуществляли секвенирование каждого повтора. Полученная кодирующая последовательность CRABP1 сирийского хомяка была зарегистрирована в базе данных GenBank под номером GQ139546.1. Предшественники малых шпилечных РНК к кодирующей последовательности CRABP1 были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1 рго по сайтам AgeI и EcoRI. В данной работе использовались следующие последовательности shRNA:

Результаты

Экспрессия эндогенного CRABP1 коррелирует с уровнем спонтанной метастатической активности RSV-трансформированных фибробластов хомяка.

Для исследований *in vivo* была использована ранее полученная экспериментальная модель, включающая панель стабильных клеточных линий единого происхождения – эмбриональных фибробластов сирийского хомяка, трансформированных вирусом саркомы Пауса (см. рис. 1А). Все эти линии характеризуются равно высоким уровнем туморогенности и метастазирования в легкие при внутривенном введении животным, но принципиально различным уровнем органоспецифического метастазирования в легкие в тесте на спонтанную метастатическую активность (СМА) при подкожном введении клеток (рис. 2А). В тесте на СМА исследуемые клетки проходят все этапы процесса метастазирования от формирования подкожной опухоли до образования очагов вторичного роста в легких.

Таким образом, используемая модель позволяет исследовать спонтанную метастатическую активность клеток на иммунокомпетентных животных, что наиболее адекватно отражает процесс метастазирования, происходящий в естественных условиях.

В данной работе использовались низкометастазная (Н/М) линия HET-SR, исходно высокометастазные (В/М) линии HET-SR-1 и HET-SR-8 и В/М линия HET-SR-2SC, полученная в ходе селекции клеток HET-SR *in vivo* (после 2 последовательных подкожных введений животным и последующего отбора из метастазов в лимфоузлы). Представленная панель линий получена в лаборатории противоопухолевого иммунитета НИИ Канцерогенеза РОНЦ РАМН, ранее подробно охарактеризована и многократно использовалась в работах российских ученых и зарубежных коллег, посвященных исследованию процесса метастазирования [6; 7; 15]. Ранее при сравнении профилей экспрессии белков в высоко- и низкометастазных линиях методом двумерного гель-электрофореза было обнаружено отсутствие продукции CRABP1 в Н/М линии HET-SR и высокий уровень данного белка в В/М линии HET-SR-1 (Э.И. Зуева, Institut Curie, Париж, Франция; персональное сообщение).

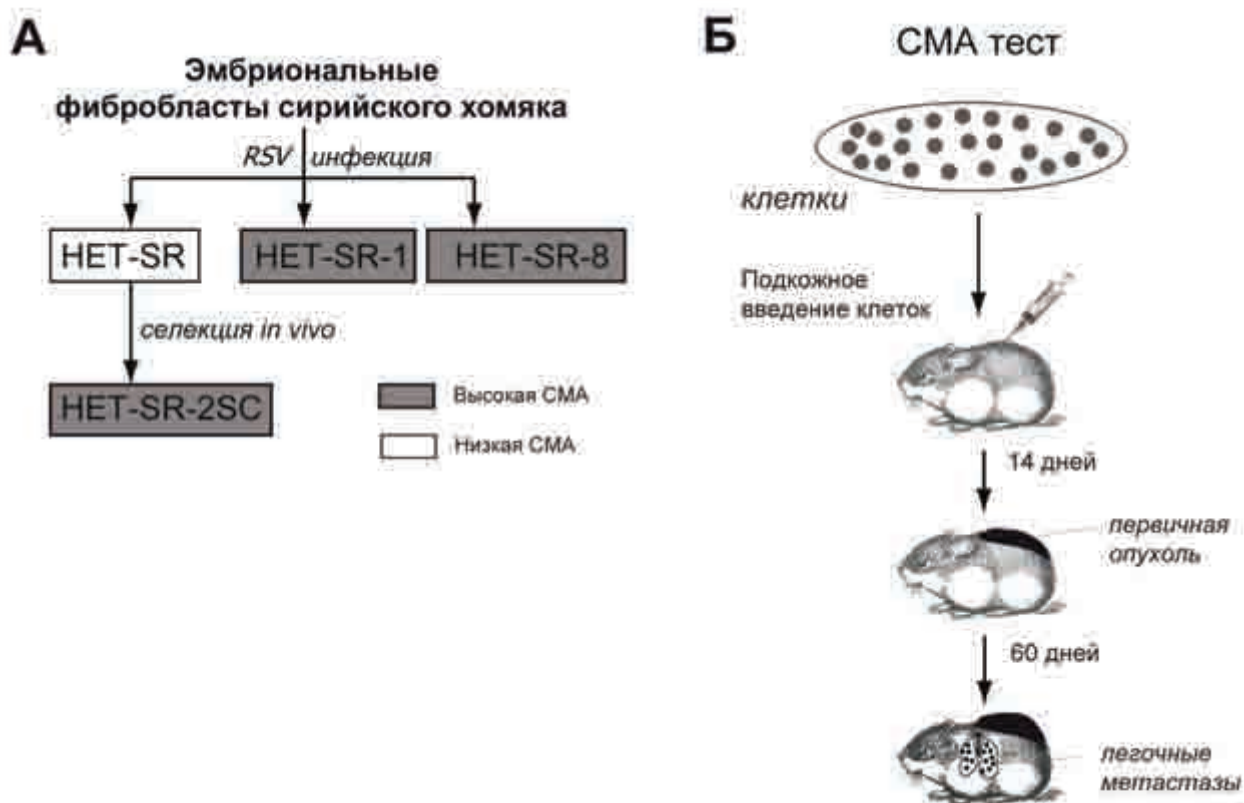


Рис. 1. Схема получения исходных линий и теста на спонтанную метастатическую активность:

А: панель исходных клеточных линий RSV-трансформированных фибробластов сирийского хомяка с разным уровнем СМА;
Б: тест на спонтанную метастатическую активность.

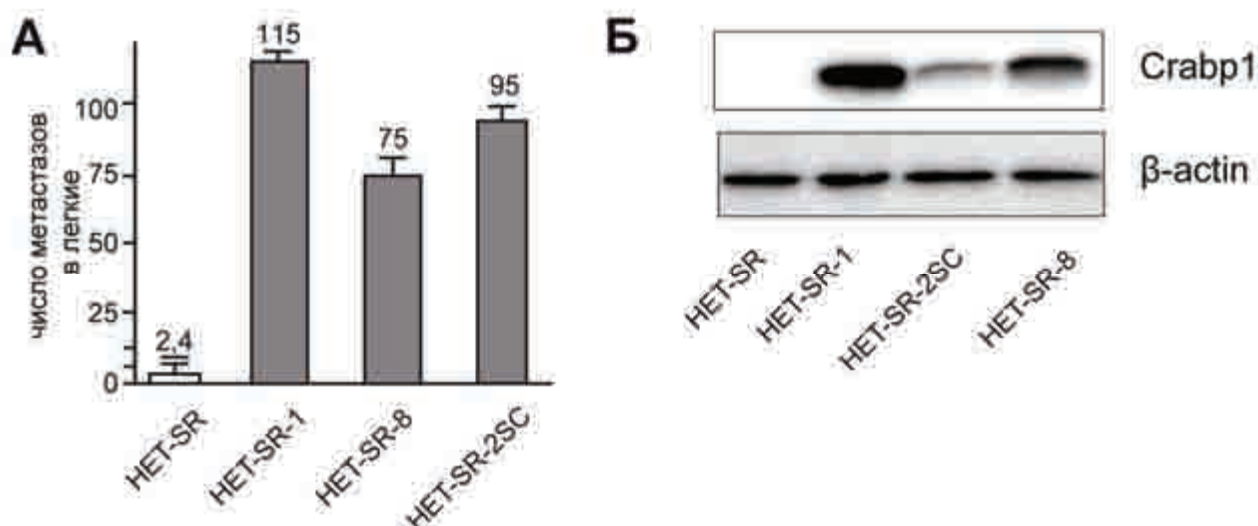


Рис. 2. Экспрессия эндогенного CRABP1 коррелирует с уровнем спонтанной метастатической активности:

А: уровень СМА клеточных линий; белый цвет – Н/М линия, серый цвет – В/М линия;
Б: сравнение продукции эндогенного белка CRABP1 в исходных линиях с различным уровнем СМА методом иммуноблоттинга.

Этот факт поставил вопрос о возможной роли CRABP1 в формировании высокометастазного фенотипа клеток. Проведенное методом ОТ-ПЦР сравнение уровней мРНК *CRABP1* подтвердило, что данный ген экспрессируется на высоком уровне в В/М линии HET-SR-1 и практически не экспрессируется в Н/М линии HET-SR. Далее был проведен сравнительный анализ белковой продукции CRABP1 в клетках с различным уровнем СМА, включая как исходно В/М линии (HET-SR-1, HET-SR-8), так и В/М производную линию HET-SR-2SC. Как видно из рис. 2Б, все высокометастазные линии отличались значительно более высоким уровнем белка CRABP1 по сравнению с Н/М линией HET-SR. Таким образом, в рамках данной экспериментальной модели мы наблюдали прямую корреляцию между уровнем СМА и экспрессией белка CRABP1. Экспрессия экзогенного CRABP1 приводит к усилению туморогенности и метастатической активности низкометастазной линии HET-SR. Для определения роли CRABP1 в формировании высокометастазного фенотипа клеток данный белок экспрессировали в Н/М линии HET-SR. Для этого кодирующая последовательность гена *CRABP1* хомяка была клонирована в ретровирусный вектор pLXSN. Линия HET-SR, стабильно экспрессирующая CRABP1, была получена методом ретровирусной инфекции. Проверка экспрессии экзогенного белка CRABP1 проводилась методом иммуноблоттинга. На рис. 3А представлены результаты анализа экспрессии белка в полученной клеточной линии HET-SR-CRABP1 и в контрольной линии HET-SR-pLXSN, содержащей «пустой» вектор. Анализ туморогенности полученной линии проводился с помощью трансплантационного теста на сингенных животных (сирийский хомяк, *Mezocricetus auratus*). Представленные на рис. 3Б результаты трансплантационного теста показывают, что экспрессия CRABP1 статистически значимо увеличивает туморогенность (уменьшает минимальную прививочную дозу) клеток HET-SR ($p < 0,05$). Исследование влияния экспрессии белка CRABP1 на метастатическую активность клеток проводилось с помощью теста на СМА. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что экспрессия белка CRABP1 статистически значимо увеличивает СМА клеток линии HET-SR (рис. 3В). Таким образом, введение в низкометастазную клеточную линию экзогенного белка CRABP1 вызывает статистически достоверное увеличение как туморогенности, так и метастатической активности клеток.

Подавление экспрессии экзогенного CRABP1 снижает туморогенность и метастатическую активность высокометастазной линии клеток HET-SR-1. Для дальнейшего подтверждения значения экспрессии белка CRABP1 в усилении и поддержании высокометастазного клеточного фенотипа было осуществлено подавление его экспрессии в высокометастазной линии. Для данного исследования была выбрана линия HET-SR-1, отличающаяся наиболее высоким уровнем СМА и наиболее высокой экспрессией белка CRABP1 (см. рис. 1А–В). Подавление экспрессии эндогенного CRABP1 проводили с помощью экспрессии малых интерферирующих РНК. Для этого были подобраны три последовательности, кодирующие малые шпилечные РНК (shRNA) к мРНК *CRABP1* сирийского хомяка. Последовательности были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1 и введены в клетки с помощью лентивирусной инфекции. В качестве контроля использовали последовательность, кодирующую shRNA к мРНК зеленого флуоресцентного белка GFP. В полученных после отбора стабильных клеточных линиях HET-SR-1-shA, HET-SR-1-shB, HET-SR-1-shC и HET-SR-1-shGFP был проведен анализ экспрессии эндогенного CRABP1 методом иммуноблот-

тинга. Как видно на рис. 4А, во всех 3 линиях, где были экспрессированы шпилечные РНК к мРНК CRABP1, уровень продукции соответствующего белка был снижен по сравнению с контрольной линией. При этом шпилечная структура shB наиболее эффективно подавляла экспрессию белка CRABP1. Поэтому далее для экспериментов *in vivo* была выбрана линия HET-SR-1-shB (далее HET-SR-1-shCRABP1). Результаты трансплантационного теста показали достоверное ($p < 0,05$) снижение туморогенности клеток линии HET-SR-1-shCRABP1 по сравнению с контрольной линией (рис. 4Б). Анализ метастатической активности *in vivo* проводили с помощью теста на СМА. Как видно из рис. 4В, уровень СМА линии HET-SR-1-shCRABP1 значительно снизился по сравнению с контрольной линией HET-SR-1-shGFP ($p < 0,05$). Таким образом, подавление продукции эндогенного белка CRABP1 в высокометастазной линии HET-SR-1 приводит как к снижению туморогенности, так и к подавлению спонтанной метастатической активности. Дальнейшее исследование *in vitro* полученных клеточных линий с подавленным или гиперэкспрессией CRABP1 не выявило значимых различий в характеристиках, ассоциированных с опухолевой прогрессией. В частности, полученные линии не отличались от контролей по основным клеточным характеристикам, таким как скорость пролиферации, уровень миграции в тесте на «заращение ран» *in vitro*, клоногенность и др. (данные не приводятся). Таким образом, вопрос о конкретных механизмах воздействия CRABP1 на метастатический фенотип клеток остается открытым. Основываясь на литературных данных, мы предполагаем, что экспрессия CRABP1 может приводить к уменьшению биодоступности РК за счет стимуляции ее метаболизма и/или секвестрирования в цитоплазме. Это может приводить к снижению клеточной дифференцировки, что является признаком агрессивности клеточных линий в экспериментальных моделях и одним из основных показателей опухолевой прогрессии и неблагоприятного прогноза в клинической практике. Низкий уровень клеточной дифференцировки, наряду с повышенной туморогенностью и способностью к метастазированию, является одной из основных характеристик опухолевых стволовых клеток [9; 12; 18]. Также известно, что РК способна стимулировать дифференцировку нормальных стволовых клеток различного происхождения [5; 10; 16]. Показано, что РК стимулирует дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека [17] и экспериментальных животных [13]. Можно предположить, что в нашей системе гиперэкспрессия CRABP1 приводит к обогащению клеточной культуры опухолевыми стволовыми клетками, однако эта гипотеза требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Выводы

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о важной роли CRABP1 в опухолевой прогрессии и формировании метастатического фенотипа клеток. В исследуемой модельной системе экспрессия данного белка коррелирует с уровнем спонтанной метастатической активности. Введение в низкометастазную линию экзогенного белка приводит к значительному повышению как туморогенности, так и метастатической активности клеток. И наоборот, подавление эндогенного CRABP1 в высокометастазной линии ведет к снижению метастатической активности и туморогенности клеток. Дальнейшее исследование этого явления, а также идентификация молекулярных механизмов CRABP1-зависимой стимуляции прогрессии солидных опухолей открывают новые перспективы для генонаправленной терапии ЗНО.

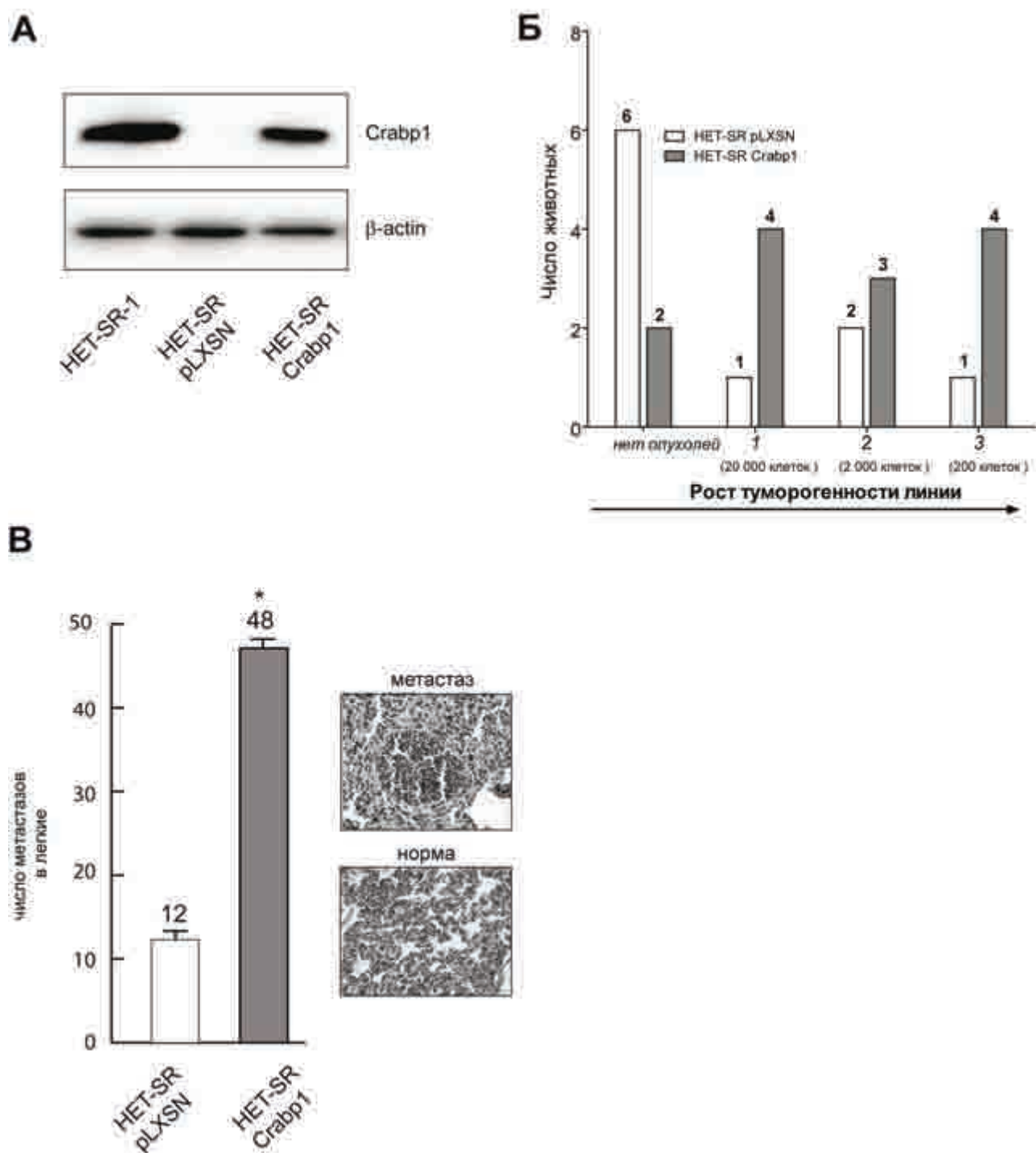


Рис. 3. Экспрессия экзогенного CRABP1 приводит к усилению опухоленности и метастатической активности низкометастазной линии HET-SR:

А: проверка экспрессии экзогенного белка CRABP1 методом иммуноблоттинга в клетках HET-SR; в качестве положительного контроля приведена линия HET-SR-1;

Б: сравнение опухоленности клеток HET-SR, экспрессирующих экзогенный CRABP1, с контрольной линией; столбики отражают количество животных в каждой группе: *нет опухолей* – ни одна доза не привилась; 1 – с одной привившейся дозой 2×10^4 клеток; 2 – с двумя привившимися дозами 2×10^4 и 2×10^3 клеток; 3 – с тремя привившимися дозами 2×10^4 , 2×10^3 и 2×10^2 клеток;

В: сравнение уровня СМА клеток HET-SR, экспрессирующих экзогенный CRABP, с контрольной линией. В качестве иллюстрации приведены характерные образцы гистологических срезов легких, окрашенных гематоксилин-эозином, с наличием и отсутствием метастазов.

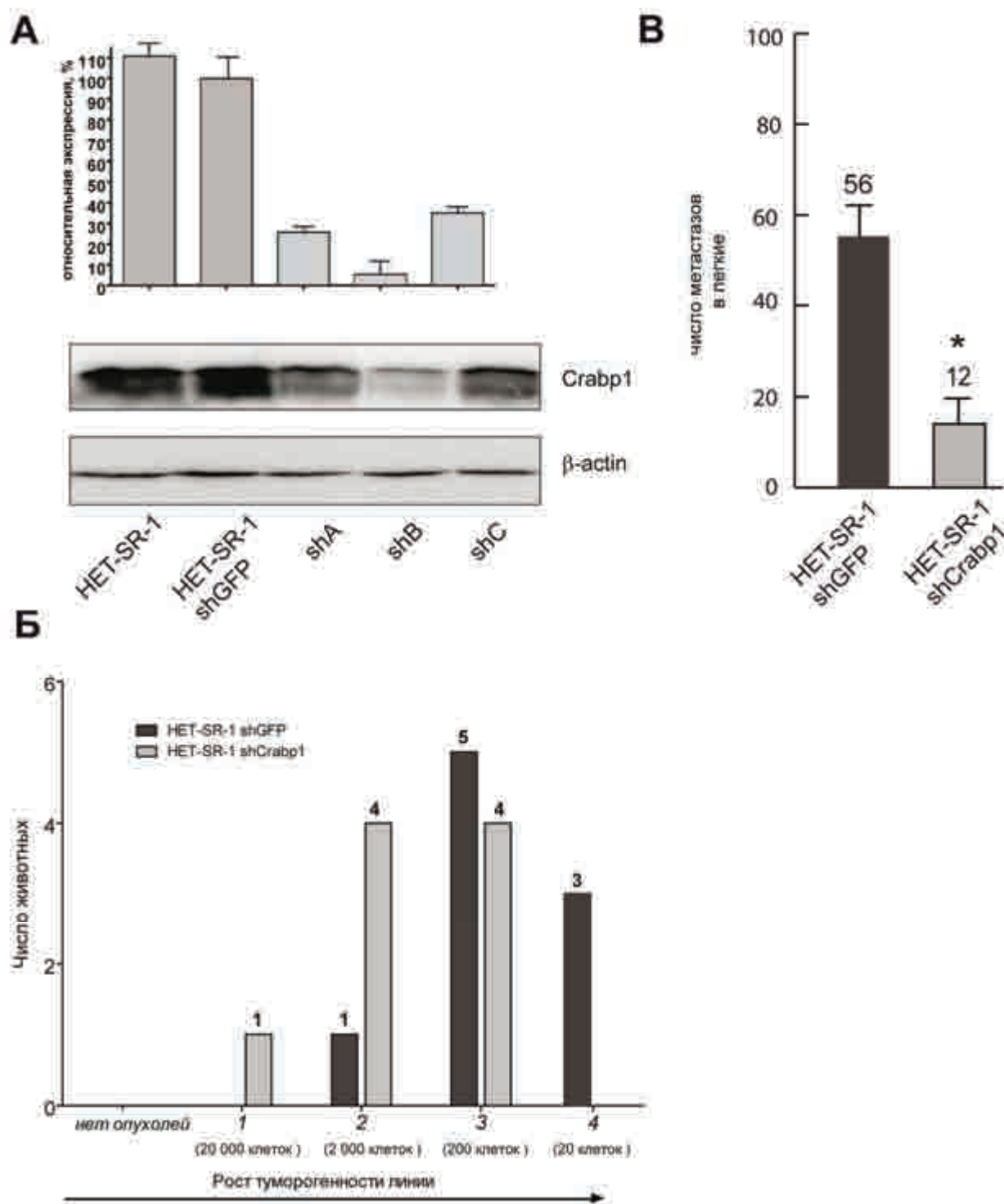


Рис. 4. Подавление экспрессии экзогенного CRABP1 снижает туморогенность и метастатическую активность высокометастазной линии клеток HET-SR-1:

А: проверка подавления экспрессии эндогенного белка CRABP1 методом иммуноблоттинга в клетках производных линии HET-SR-1, экспрессирующих малые шпилечные РНК к последовательности CRABP1;

Б: сравнение туморогенности клеток HET-SR-1, экспрессирующих малые шпилечные РНК к последовательности CRABP1, с контрольной линией; столбики отражают количество животных в каждой группе: *нет опухолей* – ни одна доза не привилась; 1 – с одной привившейся дозой 2×10^4 клеток; 2 – с двумя привившимися дозами 2×10^4 и 2×10^3 клеток; 3 – с тремя привившимися дозами 2×10^4 , 2×10^3 и 2×10^2 клеток;

В: сравнение уровня CMA клеток HET-SR-1, экспрессирующих малые шпилечные РНК, к последовательности мРНК CRABP1 (справа), с контрольной линией (слева).

Литература

1. Boylan JF, Gudas LJ. Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. // J Cell Biol. – 1991. – Vol. 112. – P. 965-79.
2. Boylan JF, Gudas LJ. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. // J Biol Chem. – 1992. – Vol. 267. – P. 21486-91.
3. Budhu A, Gillilan R, Noy N. Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. // J Mol Biol. – 2001. – Vol. 305. – P. 939-49.
4. Chen AC, Yu K, Lane MA, Gudas LJ. Homozygous deletion of the CRABPI gene in AB1 embryonic stem cells results in increased CRABPII gene expression and decreased intracellular retinoic acid concentration. // Arch Biochem Biophys. – 2003. – Vol. 411. – P. 159-73.
5. Christie VB, Maltman DJ, Henderson AP, Whiting A, Marder TB, Lako M, et al. Retinoid supplementation of differentiating human neural progenitors and embryonic stem cells leads to enhanced neurogenesis in vitro. // J Neurosci Methods. – 2010. – Vol. 193. – P. 239-45.
6. Deichman GI, Kluchareva TE, Matveeva VA, Kushlinsky NE, Bassalyk LS, Vendrov EL. Clustering of discrete cell properties essential for tumorigenicity and metastasis. I. Studies of Syrian hamster embryo fibroblasts spontaneously transformed in vitro. // Int J Cancer. – 1989. – Vol. 44. – P. 904-7.
7. Deichman GI, Kashleva HA, Kluchareva TE, Matveeva VA. Clustering of discrete cell properties essential for tumorigenicity and metastasis. II. Studies of Syrian hamster embryo fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. // Int J Cancer. – 1989. – Vol. 44. – P. 908-10.
8. Levadoux-Martin M, Li Y, Blackburn A, Chabanon H, Hesketh JE. Perinuclear localisation of cellular retinoic acid binding protein I mRNA. // Biochem Biophys Res Commun. – 2006. – Vol. 340. – P. 326-31.
9. Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol. 107. – P. 18115-20.
10. Niu CS, Li MW, Ni YF, Chen JM, Mei JM, Li J, et al. Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells. // J Exp Clin Cancer Res. – 2010. – Vol. 29. – P. 113.
11. Ruff SJ, Ong DE. Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria. // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 487. – P. 282-6.
12. Shi MF, Jiao J, Lu WG, Ye F, Ma D, Dong QG, et al. Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line. // Cell Mol Life Sci. – 2010. – Vol. 67. – P. 3915-25.
13. Su ZY, Li Y, Zhao XL, Zhang M. All-trans retinoic acid promotes smooth muscle cell differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. // J Zhejiang Univ Sci B. – 2010. – Vol. 11. – P. 489-96.
14. Tang XH, Vivero M, Gudas LJ. Overexpression of CRABPI in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes in mouse skin topically treated with all-trans retinoic acid. // Exp Cell Res. – 2008. – Vol. 314. – P. 38-51.
15. Tchekvina E, Agapova L, Dyakova N, Martinjuk A, Komelkov A, Tatosyan A. The small G-protein RalA stimulates metastasis of transformed cells. // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – P. 329-35.
16. Yu C, Liu Y, Miao Z, Yin M, Lu W, Lv Y, et al. Retinoic acid enhances the generation of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cell-derived hemato-vascular precursors. // Blood. – 2010. – Vol. 116. – P. 4786-94.
17. Zhang W, Deng ZL, Chen L, Zuo GW, Luo Q, Shi Q, et al. Retinoic acids potentiate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. // PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – P. e11917.
18. Zhou S, Li F, Xiao J, Xiong W, Fang Z, Chen W, et al. Isolation and identification of cancer stem cells from human osteosarcom by serum-free three-dimensional culture combined with anticancer drugs. // J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. – 2010. – Vol. 30. – P. 81-4.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.65-006.6-02:577.161.2(571.1)

*В.Л. Карапетян, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, С.О. Никогосян, В.В. Кузнецов***ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА (P53, BCL-2, BAX)****И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ****ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКОВ РАННИХ СТАДИЙ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Карапетян Виктория Лаертовна, соискатель отделения онкогинекологии НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)778-93-60;**e-mail:** vikakarapetyan@mail.ru

Статья поступила: 16.01.2011, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Злокачественные эпителиальные опухоли яичников являются одной из основных причин смертности среди женщин. Расширение знаний о молекулярных маркерах и изучение экспрессии последних поможет прогнозировать течение заболевания и, соответственно, разработать оптимальную тактику дальнейшего лечения больных раком яичников ранних стадий. Большое внимание уделяется изучению маркеров, характеризующих апоптоз.

Иммуногистохимическим методом в ткани первичной опухоли 48 больных морфологически верифицированными злокачественными эпителиальными новообразованиями яичников было проведено изучение экспрессии белков *p53*, *Bcl-2*, *Bax*. Проанализированы корреляции значения экспрессии белков в зависимости от клинико-морфологических особенностей опухоли. Показано, что больные раком яичников ранних стадий с высокой экспрессией *p53* в первичной опухоли имеют неблагоприятный прогноз выживаемости.

Ключевые слова: рак яичников ранних стадий, белки *p53-mut*, *Bcl-2* и *Bax*, прогноз течения заболевания.*V.L. Karapetyan, E.V. Stepanova, A.Yu. Baryshnikov, S.O. Nikogosyan, V.V. Kuznetsov***EXPRESSION OF APOPTOSIS PROTEINS (P53, BCL-2, BAX)****AND THEIR PROGNOSTIC SIGNIFICANCE****IN EPITHELIAL OVARIAN TUMORS AT THE EARLY STAGES OF DISEASE***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Centre of RAMS, Moscow***Abstract**

Malignant epithelial ovarian tumors are a major cause of mortality among women. Increased knowledge of the molecular markers and studying their expression can help predict the course of the disease, and accordingly develop the optimal tactics for further treatment of patients with ovarian cancer early stages. Much attention is paid to the study of markers that characterize apoptosis.

Immunohistochemical analysis of primary tumor tissue of patients verified morphologically malignant epithelial ovarian neoplasms. We have examined the expression of apoptotic proteins *p53*, *Bcl-2*, *Bax* and analyzed the correlation of protein expression depending on the clinical and morphological features of the tumor. Here we show that proteins with early stages ovarian cancer have a poor prognosis if the high expression of *p53* is observed in primary tumor.

Key words: ovarian cancer early stage, the protein *p53-mut*, *Bcl-2* and *Bax*, prognosis of disease.**Введение**

Злокачественные опухоли яичников – одна из актуальных проблем в клинической онкологии. РЯ занимает 4 место в структуре онкологических заболеваний органов женской репродуктивной системы, уступая по частоте раку молочной железы, эндометрия и шейки матки. При этом самое большое количество женщин, заболевших злокачественными опухолями половых органов, умирает от рака яичников (50–65 %) [7].

По сводным данным популяционных раковых регистров стран Европы, пятилетняя выживаемость больных этой категории не превышает 35 % [1].

Причинами высокой смертности больных злокачественными опухолями яичников являются бессимптомное течение заболевания на ранних стадиях, что приводит к позднему обращению больных к врачу и, следовательно, распознаванию патологии на поздних стадиях, а также низкая эффективность лечения при распространенной опухоли [4; 6].

Одним из наиболее интересных и перспективных направлений в диагностике злокачественных

опухолей является определение опухолевых маркеров. Определение различных маркеров в клетках опухоли или в жидкостях организма (в крови, асцитической жидкости, в моче, и т.д.) может давать дополнительную информацию о биологической особенности опухоли: о темпах ее роста, способности к инвазии и метастазированию, устойчивости к химиопрепаратам. Большое внимание уделяется изучению маркеров, характеризующих апоптоз [2].

Центральную роль в развитии апоптоза играет ген-супрессор опухолевого роста и соответствующий ему белок *p53* [5]. Мутации *p53* – самое частое генетическое нарушение при развитии злокачественных опухолей. Появление мутантных форм этого гена приводит к накоплению в опухолевых клетках неактивных форм белка, которые не могут выполнять функции нормального *p53* [16]. Мутации этого гена могут быть сопряжены с агрессивным течением заболевания и устойчивостью опухолевых клеток к воздействию противоопухолевых лекарств и лучевой терапии. [15; 17]. При РЯ, по данным различных исследователей, мутантный *p53* обнаруживается у 44–64 % больных [19].

Появление мутантного *p53* в ткани опухоли обнаруживается уже на ранних стадиях болезни [10; 11]. Однако при I–II стадиях РЯ мутантный *p53* выявляется значительно реже, чем при III–IV: 23 и 57 % соответственно [14]. Установлено также, что наиболее часто экспрессия мутантного *p53* наблюдается при серозной цистаденокарциноме (57,9 %), и сравнительно реже отмечается при эндометриоидной (25,6 %) и муцинозной аденокарциноме (22 %) [13].

Большое внимание уделяется изучению корреляции между экспрессией *p53* и выживаемостью больных РЯ [8; 21]. По данным многих авторов высокая экспрессия белка *p53* коррелирует с низкой общей выживаемостью [12; 22].

Таким образом, мутации *p53* нарастают при развитии РЯ или имеет место отбор *p53*-положительных опухолевых клеток, обеспечивающих агрессивное течение болезни, несмотря на проведение ХТ.

Наряду с *p53* большое значение имеют белки *Bcl* в настоящее время является одним из изученных факторов нарушения апоптоза в опухолевых клетках. Эти белки подавляют апоптоз в клетках злокачественной опухоли и принадлежат к большому семейству генов, продукты которых обладают как антиапоптотическим (например *Bcl-2*), так и проапоптотическим действием (*Bax* и др.). Показано, что гиперэкспрессия *Bcl-2* сообщает клеткам лекарственную устойчивость, а экспрессия *Bcl-2* в опухолевых клетках в целом рассматривается как неблагоприятный фактор прогноза. Экспрессию *Bcl-2* находят в 38–50 % случаев РЯ [18].

Проапоптотический белок *Bax* семейства *Bcl* является индуктором (промотором) апоптоза. Экспрессия *Bax* при РЯ обнаруживается у 24–62 % больных, чаще – при серозном РЯ. Наименьшая экспрессия отмечена в муцинозных (24 %) и эндометриоидных (37 %) опухолях [9; 20]. Показано, что степень экспрессии этих белков в опухолевых клетках в отдельности от экспрессии *Bcl-2* не является важным показателем степени злокачественности опухоли. Более достоверным показателем при этом является соотношение *Bcl-2* и *Bax* [3].

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе отделения хирургической гинекологии (зав. отделением, д.м.н., профессор Кузнецов В.В.) РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН совместно с лабораторией НИИ ЭДнТО (руководитель лаборатории д.м.н., профессор Барышников А. Ю.).

В исследование включено 48 больных злокачественными эпителиальными новообразованиями яичников I–II стадий, которые находились на лечении в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клинические исследования проведены у всех пациенток. После полного обследования больных проводили основные этапы комбинированного лечения.

У всех больных методами иммуногистохимии была оценена экспрессия белков *p53* мутантного типа, *Bcl-2* и *Bax*. Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования.

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали DAB⁺ систему [DAKO]. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением $\times 10$; $\times 20$; $\times 40$. Для маркера оценивали локализацию

окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество.

В исследовании применяли следующие критерии оценки маркеров:

1. Опухоль считали отрицательной по *p53*, если в ткани опухоли отсутствовала ядерная реактивность с антителами или количество окрашенных клеток было менее 25 %; и положительной по *p53*, если было окрашено более 25 % ядер опухолевых клеток.
2. Опухоль считали отрицательной по *Bcl-2* или *Bax*, если в ткани опухоли отсутствовала цитоплазматическая реактивность с антителами или количество окрашенных клеток было менее 25 %; и положительной по *Bcl-2* или *Bax*, если было окрашено более 25 % опухолевых клеток.

Результаты иммуногистохимического исследования сопоставляли с клинико-морфологическими параметрами, характеризующими степень распространенности опухолевого процесса. Оценивали безрецидивную и общую выживаемость больных злокачественными опухолями в зависимости от стратегии лечения, клинико-морфологических факторов и значений исследованных нами молекулярно-биологических маркеров.

Результаты

Экспрессия мутантного *p53* установлена в 16 из 48 наблюдений (33,3 %). Из них в 12 случаях новообразование имело строение серозной цистаденокарциномы, в 3 – эндометриоидной и только в одном случае – муцинозной аденокарциномы.

Минимальное значение экспрессии этого маркера в ткани опухоли составило 5 %, максимальное – 100 %.

Среднее значение экспрессии мутантного *p53* в ткани серозной цистаденокарциномы составил $93,8 \pm 6,3$ % ($n=12$), в ткани эндометриоидной карциномы – $68,3 \pm 31,7$ % ($n=3$), у одной пациентки в ткани муцинозной аденокарциномы содержание белка *p53* составило 100 %.

Экспрессия маркера *p53-mut* в опухолевой ткани имела место у 46,1 % больных серозной цистаденокарциномой, у 18,8 % – эндометриоидной и у 16,7 % – муцинозной аденокарциномой ($p=0,044$), (рис. 1).

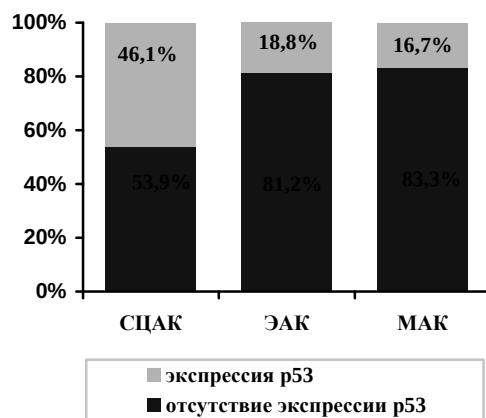


Рис. 1. Частота экспрессии мутантного *p53* в опухоли больных РЯ I–II стадий в зависимости от гистологической структуры опухоли.

Анализ показал, что в группе больных РЯ в сочетании с миомой матки случаи с мутантного p53 положительными опухолевыми клетками встречаются в 2 раза чаще (47,1 и 24,1 % соответственно, $p>0,05$). Установлено также, что у больных серозной цистаденокарциномой яичников частота случаев с p53⁺ клетками при наличии миомы матки составила 58,3 %. У пациенток, не имевших родов в анамнезе, экспрессия белка p53-мут в ткани опухоли наблюдалось в 11,1 % случаев, у тех женщин, которые рожали хотя бы один раз – в 39,4 % ($p=0,041$). У больных с высокой (G_1) степенью дифференцировки опухоли частота случаев с экспрессией белка p53 в опухолевых клетках составляла 25 %.

С умеренной (G_2) – 36,4 %, с низкой (G_3) – 35,3 % ($p>0,05$). Средний размер опухоли в группе больных серозной цистаденокарциномой с экспрессией белка p53 в опухолевых клетках был незначительно выше ($12,8\pm1,5$ и $12,1\pm1,0$ см соответственно, $p>0,05$).

Анализ отдаленных результатов лечения больных РЯ I–II стадий в зависимости от накопления мутантного белка p53 в ткани опухоли показал, что при наличии p53 все больные умерли в течение первых 6 лет, тогда как большинство (85%) пациенток с отсутствием белка пережили 10 лет после лечения ($p>0,05$; табл. 1).

Таблица 1

Отдаленные результаты лечения больных РЯ I–II стадий в зависимости от экспрессии белка p53 в ткани опухолей

Экспрессия p53	n, абс.	Медиана, мес.	Общая выживаемость, %		
			3-летняя	5-летняя	10-летняя
Нет	32	не дост.	94,7 $\pm$ 5,1	85,3 $\pm$ 10,1	85,3 $\pm$ 10,1
Есть	16	69,0 $\pm$ 15,8	90,9 $\pm$ 8,7	72,7 $\pm$ 17,7	0

При анализе 5-летней безрецидивной выживаемости установили, что в группе больных с наличием белка p53 выживаемость и медиана составили: 39,5 $\pm$ 14,8 % и 33,0 $\pm$ 5,3 мес соответственно, тогда как в группе больных с отсутствием экспрессии белка p53 выживаемость составила 77,9 $\pm$ 10,0 %, а медиана не была достигнута ($p=0,0042$).

Экспрессия белка Bcl-2 установлена только в 20 из 48 наблюдений (41,7 %). Из них в 11 (42,3 %) случаях новообразование имело строение серозной цистаденокарциномы, в 7 (43,75 %) – эндометриоидной аденокарциномы и в 2 (33,3 %) – муцинозной аденокарциномы ($p>0,05$; рис. 2).

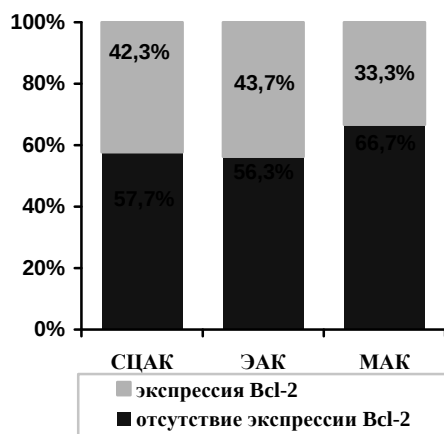


Рис. 2. Частота экспрессии Bcl-2 в опухоли больных РЯ I–II стадий в зависимости от гистологической структуры опухоли.

Экспрессия белка Bcl-2 выявлена в 42,3 % образцов серозной, 43,8 % – эндометриоидной и 33,3 % – муцинозной аденокарциномы ($p>0,05$). Среднее значение его экспрессии в ткани серозной цистаденокарциномы составило 58,9 $\pm$ 11,7 % ($n=11$), в ткани эндометриоидной карциномы – 62,9 $\pm$ 13,4 % ($n=7$), у двух пациенток в ткани муцинозной аденокарциномы содержание Bcl-2 составило соответственно 50 % и 100 %. Статистические различия не выявлены ($p>0,05$). Частота выявления белка Bcl-2 у пациенток с высокой степенью дифференцировки опухоли составила 40 % ($n=8$), умеренной – 20 % ($n=4$) и низкой – 40 % ($n=8$) случаев ($p=0,4$). У пациенток Ia,b стадий средний уровень экспрессии белка Bcl-2 в ткани опухоли составил 57,8 $\pm$ 11,8 % ($n=10$), при Ic стадии – 45 $\pm$ 15 % ($n=3$), при IIa,b стадии – 70 $\pm$ 17,9 % ($n=5$), при IIc стадии – 65 $\pm$ 35 % ($n=2$) ($p>0,05$). Частота выявления белка Bcl-2 в каждой стадии равнялась соответственно 36,4 %, 22,2 %, 66,7 % и 22,2 %. Таким образом, у больных РЯ IIa,b стадии частота выявления и уровень экспрессии белка Bcl-2 были заметно выше, чем при I стадии. Следует отметить, что у больных серозной и эндометриоидной аденокарциномой при наличии ожирения частота случаев с экспрессией белка Bcl-2 составила 83,3 % ($n=6$), у пациенток без ожирения 27,3 % ($n=12$), различия достоверны ($p=0,04$). Интересно, что у больных с Bcl-2-положительными клетками, максимальный размер опухоли в группах серозной и эндометриоидной цистаденокарциномой практически не различался и составил 13,8 $\pm$ 2,1 и 14,9 $\pm$ 0,3 см соответственно, тогда как у больных без экспрессии различия были выражены 11,8 $\pm$ 0,8 и 19,5 $\pm$ 2,7 см соответственно ($p=0,003$). Нами обнаружено также, что у больных серозной и эндометриоидной формами аденокарциномы яичников содержание СА-125 в сыворотке крови заметно выше при экспрессии Bcl-2 в опухолевых клетках ($p>0,05$; табл. 2).

Таблица 2

Зависимость уровня СА-125 от экспрессии Bcl-2

Гистологическая форма опухоли	Bcl-2	n	СА-125 МЕ/мл	
			Уровень	Медиана
СЦАК	Нет	15	395,7 $\pm$ 119,2	176,4
	Да	11	536,8 $\pm$ 370,1	218,7
ЭАК	Нет	9	381,3 $\pm$ 219,1	152,5
	Да	7	614,6 $\pm$ 277,9	391,8
МАК	Нет	4	21,5 и 41,0	31,3
	Да	2	27,0	–
Все различия не достоверны ($p>0,05$)				

Экспрессия белка Вах установлена только в 41,7 % наблюдений. Из них в 11 случаях новообразование имело строение серозной цистаденокарциномы, в 5 – эндометриоидной и в 4 – муцинозной аденокарциномы ($p > 0,05$), (рис. 3).

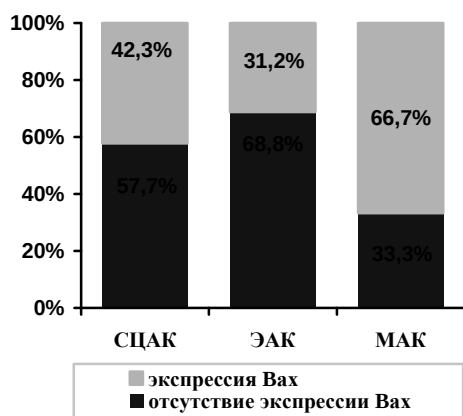


Рис. 3. Частота экспрессии Вах в опухоли больных РЯ I–II стадий в зависимости от гистологической структуры опухоли.

Уровень экспрессии Вах в тканях опухолей колебался от 15 до 100 %. Среднее значение Вах в ткани серозной аденокарциномы яичников составило $71,3 \pm 10,5$ %, в эндометриоидной – $86,0 \pm 14,0$ %, а в муцинозной аденокарциноме во всех образцах содержание Вах равнялось 100 % ($p = 0,27$).

Таким образом, Вах чаще экспрессируется клетками муцинозной аденокарциномы (66,7 %), более того, его экспрессия максимальна, то есть достигает 100 %. Установлено, что, независимо от гистологической формы РЯ, Вах редко экспрессируется опухолью умеренной (G_2) степени дифференцировки – 9,1 %, сравнительно часто – клетками высокой (G_1) 50 % и низкой (G_3) 37,5 % степеней дифференцировки ($p > 0,05$).

Литература

1. Аксель Е.М., Козаченко В.П., Ушакова Т.И. Статистика злокачественных опухолей яичника. – Современные экспериментальные и клинические подходы к диагностике и рациональному лечению рака яичников: Сборник статей, приуроченный к ЕШО / Под ред. В.А. Горбуновой. – М., 2001. – С. 4–9.
2. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российск. Онколог. Журнал. – 1996. – №1. – С. 58–61.
3. Белушкина Н.Н., Северин С.Н. Молекулярные основы патологии апоптоза // Архив патологии. – 2001. – Т. 63, № 1. – С. 51–60.
4. Жордания К.И. Злокачественные эпителиальные опухоли яичников // Современная онкология. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 14–22.
5. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза (обзор) // Биохимия. – 2000. – 65. – С. 5–33.
6. Нечаева И.Д. Опухоли яичников. – Л.: Медицина, 1987. – 215 с.
7. Урманчеева А.Ф., Мешкова И.Е. Вопросы эпидемиологии и диагностики рака яичников // Практическая онкология. – 2000. – № 4. – С. 7–13.
8. Anttila M., Kosma V., Hongxiu J. et al. p21/WAF1 expression as related to p53, cell proliferation and prognosis of ovarian cancer // Br. J. Cancer. – 1999. – 79. – P. 11–2.
9. Baekelandt M., Holm R., Nesland J. et al. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancers // J. Clin. Oncol. – 2000. – 18. – P. 3775–81.
10. Caduff R., Svoboda-Newman S., Ferguson A. et al. Comparison of mutations of Ki-ras and p53 immunoreactivity in borderline and malignant epithelial ovarian tumors // Am. J. Surg. Patol. – 1999. – 23(3). – P. 323–8.
11. Chan W., Cheung K., Huang L. et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers // Am. J. Pathol. – 2000. – 156(2). – P. 409–17.
12. de la Torre F.J., García A., Gil-Moreno A. et al. Apoptosis in epithelial ovarian tumours Prognostic significance of clinical and histopathologic factors and its association with the immunohistochemical expression of apoptotic regulatory proteins (p53, bcl-2 and bax) // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 2007. – 130(1). – P. 121–8.
13. Dogan E., Saygili U., Tuna B. et al. p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis // Gynecol Oncol. – 2005. – 97(1). – P. 46–52.

Не выявлено связи между частотой выявления белка Вах в опухолевых клетках и другими клиническими факторами прогноза РЯ.

Заключение

Таким образом, проведенные клиничко-молекулярные исследования показали, что экспрессия белков p53, Bcl-2 и Вах установлена в 33,3; 41,7 и 41,7 % образцов, независимо от гистологической структуры опухоли. По данным нашего исследования мутантный белок p53 почти в 3 раза чаще экспрессируется клетками серозной аденокарциномы яичников относительно эндометриоидной и муцинозной форм рака яичников. Анализ показал, что в группе больных РЯ, сопровождающимся миомой матки, случаи с мутантными p53⁺ опухолевыми клетками встречаются в 2 раза чаще (47,1 % и 24,1 % соответственно, $p > 0,05$). У рожавших пациенток экспрессия белка p53 в ткани опухоли наблюдалась намного чаще (39,4 % случаев), чем у нерожавших (11,1 % случаев, $p = 0,041$). Анализ отдаленных результатов больных показал, что экспрессия мутантного белка p53 в ткани опухоли коррелирует с низкой 5-летней безрецидивной выживаемостью больных ($39,5 \pm 14,8$ % против $77,9 \pm 10,0$ %, $p = 0,0042$). Экспрессия Bcl-2 чаще отмечена у больных со II стадией РЯ, к тому же степень экспрессии маркера была самой высокой именно при этой стадии. Выраженная экспрессия белка Bcl-2 сочеталась с высоким уровнем СА-125 в сыворотке крови. Белок Вах чаще экспрессировался клетками муцинозной аденокарциномы (66,7 %), и именно при этой форме опухоли экспрессия Вах была максимальна и достигала 100 %. При этом анализ отдаленных результатов лечения больных в зависимости от экспрессии белков Bcl-2 или Вах не выявил достоверной прогностической значимости этих маркеров. Таким образом, накопление мутантного белка p53 в опухолевых клетках больных может рассматриваться как неблагоприятный прогностический фактор, а экспрессия белков Bcl-2 и Вах несет незначительную информацию при раке яичников начальных стадий.

14. Ferrandina G., Fagotti A., Salerno M. et al. p53 overexpression is associated with cytoreduction and response to chemotherapy in ovarian cancer // Br. J. Cancer. – 1999. – 81. – P. 733–40.
15. Freedman R.S., Platsoncas C.D. Immunotherapy for peritoneal ovarian carcinoma metastasis using ex vivo expanded tumorinfiltrating lymphocytes // Cancer Treat Res. – 1996. – 82. – P. 115–46.
16. Garzetti G., Giavattini A., Lucarini G. et al. Expression of vascular endothelial growth factor related to 72-kilodalton metalloproteinase immunostaining in patients with serous ovarian tumors // Cancer. – 1999. – 85(10). – P. 2219–25.
17. Ichinose Y., Yano T., Asoh H. et al. Intraoperative intrapleural hypotonic cisplatin treatment for carcinoma-tous pleuritis // J. Surg. Oncol. – 1997. – 66(3). – P. 196–200.
18. Korsmeyer S. bcl-2 initiates a new category of oncogenes regulators of cell death // Blood. – 1992. – 80. – P. 879–86.
19. Kupryjanczyk J., Dansonka-Mieszkowska A., Szymanska T. et al. Spontaneous apoptosis in ovarian carcinomas: a positive association with p53 gene mutation is dependent on growth fraction // Br. J. Cancer (Scotland). – 2000. – 82. – P. 579–83.
20. Marx D., Binder C., Meden H. et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer // Anticancer Res. – 1997. – 17(3). – P. 2233–40.
21. Nielsen J.S., Jakobsen E., Hølund B. et al. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer // Int J Gynecol Cancer. – 2004. – 14(6). – P. 1086–96.
22. Skirnisdóttir I., Seidal T., Sorbe B. A new prognostic model comprising p53, EGFR, and tumor grade in early stage epithelial ovarian carcinoma and avoiding the problem of inaccurate surgical staging // Int. J. Gynecological Cancer. – 2004. – 14(2). – P. 259–70.

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.

(продолжение см. на стр. 50)

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ» (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

Выравнивать по центру и устанавливать красную строку для всего перечисленного также не нужно.

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

В начале статьи должно быть приведено **Резюме**. В нем должны быть кратко без рубрики указаны цель исследования, материалы и методы, полученные автором результаты и основные выводы. В конце резюме автор приводит **Ключевые слова** работы (не более 5). Рекомендуемый объем реферата – 500–1000 печатных знаков. Отступление от этой схемы допустимо только в отношении обзорных статей.

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

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

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

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

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

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

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

(продолжение см. на стр. 54)

УДК 616.381-033.217-085.3

*К.С. Титов¹, М.В. Киселевский¹, Л.В. Демидов¹, В.Ю. Сельчук¹, А.Н. Грицай¹, Э.Х. Кучмезов²***ВНУТРИБРЮШИННАЯ БИОТЕРАПИЯ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И ДОНОРСКИХ ЛАК-КЛЕТОК
ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКИХ АСЦИТАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ**¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²Центральная клиническая больница №2 Управления делами Президента РФ, Москва**Контактная информация***Титов Константин Сергеевич, канд. мед. наук, врач-хирург отделения биотерапии опухолей НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-90-04;**e-mail:** ks-titov@mail.ru

Статья поступила: 25.11.2010, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Опухолевые асциты часто сопровождают течение рака яичников, являются жизнеугрожающими осложнениями опухолевого процесса, нередко рецидивируя после лекарственного противоопухолевого лечения. Системная и внутрибрюшинная химиотерапия не всегда вызывает длительные ремиссии, а также сопровождается выраженными побочными эффектами. Внутрибрюшинная иммунотерапия опухолевых (метастатических) асцитов интерлейкином-2 в комбинации с аллогенными (донорскими) лимфокин-активированными киллерами и ИЛ-2 в монорежиме характеризуется высокой эффективностью и хорошей переносимостью у больных раком яичников. Объективный эффект данного лечения составил 82,6 и 70,6% соответственно. Предложенный вид биотерапии может рассматриваться как один из этапов комбинированного лечения данной категории больных, имеет хорошую переносимость, улучшает продолжительность и качество их жизни.

Ключевые слова: рак яичников, опухолевые асциты, интерлейкин-2, ЛАК-клетки, внутрибрюшинная биотерапия.

*K.S. Titov¹, M.V. Kiselevsky¹, L.V. Demidov¹, V.Yu. Sel'chuk¹, A.N. Gritzay¹, E.H. Kuchmezov²***INTRAPERITONEAL INTERLEUKIN-2
AND ALLOGEN LYMPHOKINE ACTIVATED KILLERS BIOTHERAPY
OF MALIGNANT PERITONEAL EFFUSIONS IN OVARIAN CANCER PATIENTS**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²Central clinical hospital №2 Prezident Russian, Moscow**Abstract**

Malignant peritoneal effusions often arise in patients with ovarian cancer which is considered to be a dangerous complication of cancer. Intraperitoneal chemotherapy is ineffective in generally and causes side effects. Here we show that intraperitoneal IL-2/lymphokine activated killers and IL-2 biotherapy demonstrated the high efficacy in threatment of ovarian cancer patients with malignant peritoneal effusions. The objective effect was 82,6 % and 70,6 % accordingly. These results indicates that intraperitoneal biotherapy might be one of the stages of combined treatment of such group of patients The suggested type of biotherapy increases the survival and life quality of patients.

Key words: ovarian cancer, malignant peritoneal effusions, interleukin-2, LAK-cells, intraperitoneal biotherapy.

Введение

Опухолевый асцит (ОА) более чем у 50 % онкологических больных проявляется как первый симптом злокачественной опухоли внутрибрюшной локализации. Наиболее часто ОА осложняется течение рака яичников. Развитие метастазов по брюшине и в большом сальнике обычно сопровождается появлением асцитической жидкости, которая, в свою очередь, способствует дальнейшему прогрессированию имплантационного метастазирования [10].

При напряженном ОА происходит компрессия внутренних органов брюшной и грудной полостей, а при частых лапароцентезах без эффективного противоопухолевого лечения быстро наступает обезвоживание, нарушение белково-электролитного равновесия, декомпенсация и смерть больной.

Патофизиология опухолевого асцита многофакторна. Повышение продукции жидкости брюшиной вызвано, прежде всего, увеличением капиллярной проницаемости вследствие микроваскуляризации опухоли

и нарушения лимфатического перитониального дренажа – главного фактора в формировании ОА [7; 8]. Кроме того, показано, что при опухолевом поражении брюшины приток плазмы в брюшную полость увеличивается в 6–16 раз [11].

Одним из наиболее распространенных вариантов медицинской помощи при ОА у больных раком яичников является лапароцентез. Эвакуация асцитической жидкости из брюшной полости приводит к снижению выраженности клинических симптомов: улучшает общее состояние больного, исчезают или резко уменьшаются боли в животе и одышка. В большинстве случаев после удаления асцита возникает быстрое повторное накопление жидкости, требующее частых лапароцентезов. У пациенток с ОА, которым на одном из этапов лечения выполнялась операция, развиваются спайки, препятствующие полному удалению жидкости. При повторных лапароцентезах часто возникают осложнения, связанные с повреждением сосудов и внутренних органов, нередко инфекционные процессы.

По данным различных авторов около 50–70 % больных раком яичников к началу первичного лечения имеют выпоты в серозных полостях – асцит, плеврит. При диагностической лапароскопии наличие асцита различной степени выраженности выявлено у 81 % больных раком яичников [1–2]. Пятилетняя выживаемость пациенток с асцитными формами РЯ составляет около 5 %, а у пациенток без асцита – 45 %.

В лечении диссеминированного РЯ основная роль отводится комбинированному методу лечения (циторедуктивные операции + химиотерапия). Наиболее активными препаратами для лечения РЯ были и остаются таксаны и препараты платины. Химиотерапия 1 линии (комбинация таксанов с производными платины) позволяет в ряде случаев успешно справиться с канцероматозом брюшины и опухолевым асцитом при диссеминированном РЯ (объективный ответ до 67 %). В последующем при внутрибрюшных рецидивах, которые возникают в 75–80 % случаев в течение 6 и более месяцев, показана 2 линия химиотерапии (топотекан, доксорубин, гемцитабин, ифосфамид), имеющая часто только паллиативный характер, поскольку ее эффективность колеблется от 12 до 40 % при средней продолжительности жизни 9–12 мес [3; 4; 6].

Одним из наиболее эффективных методов лечения распространенного РЯ, в том числе сопровождающегося накоплением асцита, является внутрибрюшинная химиотерапия (ВбХТ). Часть цитостатика из брюшной полости поступает в системный кровоток, поэтому его безопасные дозировки при внутрибрюшинном введении, как правило идентичны таковым при системной химиотерапии. Выделяют три фактора ограничивающих применение ВбХТ:

1. Ограниченное проникновение цитостатика в ткани (приблизительно 1 мм).
2. Неравномерное распределение препарата по брюшине.
3. Технические трудности долгосрочного брюшинного доступа и осложнения [5].

В любом из этих случаев ВбХТ назначается пациенткам с ОА, у которых максимальный размер опухолевых узлов не превышает 0,5–1,0 см или пациенткам без остаточной опухоли после циторедуктивной операции [13].

Таким образом, системная и внутрибрюшинная химиотерапия при диссеминированном раке яичников, осложненном метастатическим асцитом, не всегда оказывают положительный эффект, достаточно токсичны и нередко вызывают осложнения у больных.

При неэффективности системной химиотерапии у больных с диссеминированным РЯ с ОА используют также и внутрибрюшинные введения различных иммуномодуляторов. Установлено, что наибольшей эффективностью обладают цитокины ИЛ-2 и интерферона- γ [14]. В частности, проведенные клинические исследования E. Pujade-Lauraine et al. в 1996 г. показали, что внутрибрюшинное введение ИНФ- γ приводило к полному ответу у 23 % больных с химиорезистентными формами РЯ, осложненных ОА [15].

R.S. Feedman. et al. в 2000 г. опубликовали данные о том, что внутрибрюшинное введение ИЛ-2 в комбинации с ИНФ- γ и активированными *ex vivo* лимфоцитами выделенными из ОА приводило не только к регрессии экссудата у больных РЯ, но также в ряде случаев отмечалось значительное снижение маркера СА-125 и стабилизация заболевания до 18 мес [9].

Полное исчезновение асцита было отмечено в 56–60 % случаев при внутрибрюшинном использовании рекомбинантного ИЛ-2 и ЛАК-клеток у больных прогрессирующим химиорезистентным раком яичников [1].

Z. Nau et al. сообщили об использовании ТП, которые были выделены из первичной опухоли или метастатических узлов для лечения 25 больных раком яичников в сочетании с химиотерапией. В результате рандомизированного исследования наблюдалась более высокая скорость нарастания эффекта (резкое снижение уровня СА-125 и регрессия опухоли по данным УЗИ). У пациенток, получавших кроме стандартного лечения еще ЛАК-терапию, в трех случаях уже после первого курса химиотерапии в комбинации с ЛАК отмечена 75% регрессия опухоли и исчезновение асцита. Время сохранения эффекта в данной группе было достоверно больше (разница 18 мес.) Клинический эффект связывался с активацией эффекторов клеточного иммунитета, которые вызывали лизис опухолевых клеток в асците. При действии иммуномодуляторов было отмечено уменьшение объемов опухоли у 20 % пациенток. Побочные эффекты были умеренными и включали лихорадку, озноб, не выраженную тошноту и спастические боли в брюшной полости [16].

В наиболее крупных исследованиях суммарная эффективность другого вида внутриполостной биотерапии – внутривисцеральной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии при метастатических плевритах у больных с различными злокачественными опухолями, включая рак яичников составила 94,5 % [5; 12; 14].

Данные об эффективности и хорошей переносимости внутрибрюшинной биотерапии свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения этого перспективного и безопасного метода лечения ОА у больных раком яичников.

Цель исследования – оценка клинической эффективности, переносимости и преимуществ для практического применения внутрибрюшинной биотерапии опухолевых асцитов у больных раком яичников с использованием ИЛ-2 («Ронколейкин», ООО «Биотех», Санкт-Петербург) в монорежиме и в комбинации с аллогенными ЛАК-клетками.

Материалы и методы

В исследование включены 40 пациенток, страдавших раком яичников, осложненным метастатическими асцитами, в возрасте 37–72 лет. К началу внутрибрюшинной ИЛ-2-иммунотерапии или ИЛ-2 в комбинации с аллогенными ЛАК помимо асцита у пациенток, как правило, также имелись и другие метастатические проявления опухолевого процесса. Состояние всех больных было расценено как средней тяжести. До начала внутрибрюшинной иммунотерапии все пациентки получали комбинированное лечение, как правило, хирургическое в комбинации с ПХТ, преимущественно – с применением таксанов и препаратов платины.

Для проведения внутрибрюшинной биотерапии брюшная полость, чаще – под контролем УЗИ, дренировалась под местной анестезией на срок от 14 до 21 дней. Для дренирования брюшной полости использовали набор «Плеврокан» («B. Braun», USA). Брюшная полость через день максимально осушалась перед введением биопрепарата.

На цитологическое исследование экссудат отправляли до проведения иммунотерапии, в середине курса и по его окончании.

Для получения аллогенных ЛАК-клеток периферическая кровь здоровых доноров, полученная путем сепарации в отделении переливания крови, путем центрифугирования (1000 об/мин, 20 мин) разделялась на клеточную и плазменную части. Из клеточной фракции выделялись моноклеарные лейкоциты. МЛ активировали в культуральной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением ИЛ-2 («Биотех», Россия) в концентрации 1000 МЕ/мл. Генерация из МЛ ЛАК проводилась в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С в течение 48 ч. Затем полученные ЛАК отмывались от среды, разводились в 50 мл физиологического раствора и вводились внутривнутрибрюшинно.

Оценка эффекта от лечения проводилась клинически, цитологическим методом и по уровню маркера плазмы крови СА-125 с помощью ультразвукового исследования и (или) спиральной компьютерной томографии брюшной полости.

Результаты и обсуждение

В зависимости от вида проводимой внутривнутрибрюшинной биотерапии все пациенты с опухолевыми асцитами РЯ были разделены на 2 группы:

1 группа – 23 пациентки по поводу асцита получивших внутривнутрибрюшинную ИЛ-2/аллоген. ЛАК-иммунотерапию.

2 группа – 17 пациенток по поводу асцита получивших внутривнутрибрюшинную ИЛ-2-иммунотерапию.

Все больные получили по одному курсу внутривнутрибрюшинной иммунотерапии. Каждый курс состоял из 10–15 внутривнутрибрюшинных введений аллогенных ЛАК по 100–150×10⁶ клеток и (или) ИЛ-2 (Ронколейкин) в дозе 1–2×10⁶ МЕ. Лечение проводилось ежедневно, кроме выходных дней. Курс лечения продолжался 2–3 нед.

Накопление экссудата в первые двое суток до начала иммунотерапии составляло 500–2000 мл/сутки. Во всех случаях у больных удалялся серозный или серозно-геморрагический экссудат. У всех больных до начала биотерапии опухолевый асцит был цитологически верифицирован. Как правило, эффективность лечения определяли через 3–4 нед после окончания иммунотерапии, при стойкой экссудации лечение продолжали до 1 мес.

Всего в 1 группу были включены 23 пациентки с прогрессирующим раком яичников, осложненного опухолевым асцитом и получившие адоптивную внутривнутрибрюшинную ИЛ-2/аллогенную ЛАК-терапию. По поводу основного заболевания пациентки получали лечение на протяжении 1,5–3,5 лет.

Из 23 наблюдаемых больных предшествующее внутривнутрибрюшинное введение цитостатиков (тиоф или циклофосфан) имело место у 3 (неэффективно). Следует отметить, что выраженный эффект на фоне внутривнутрибрюшинной иммунотерапии наступал только в тех случаях, когда в выпоте отмечалось значительное количество активированных лимфоидных клеток по типу иммунобластов и митозов.

Из пациенток 1 группы полный эффект был достигнут у 11 женщин (47,8 %); частичный эффект с остаточным экссудатом не вызывающим жалоб у больных – у 8 пациенток (34,8 %) и у 4 пациенток (17,4 %) эффекта от данного лечения не было.

Повторное накопление асцита возникло у 3 больных в сроки от 2 до 4 мес. после лечения. Общая эффективность внутривнутрибрюшинной ИЛ-2/аллогенной ЛАК-иммунотерапии составила 82,6 % (табл.). Медиана общей выживаемости составила 10 мес.

Во 2 группе 17 больных с химиорезистентными формами рака яичников, течение заболевания у которых осложнилось асцитом, получали внутривнутрибрюшинную ИЛ-2-иммунотерапию препаратом Ронколейкин.

По поводу основного заболевания пациентки получали лечение на протяжении 1–4 лет.

Ни у одной пациентки из этой группы предшествующего внутривнутрибрюшинного введения цитостатиков не было.

Полный эффект был достигнут у 4 женщин (23,5 %); частичный эффект с остаточным экссудатом, не вызывающим жалоб у больных – у 8 пациенток (47,1 %) и у 5 пациенток (29,4 %) эффекта от данного лечения не было.

Повторное накопление асцита возникло у 4 больных в сроки от 2 до 4 мес. Общая эффективность внутривнутрибрюшинной ИЛ-2-иммунотерапии составила 70,6 % (табл.). Медиана общей выживаемости составила 9 мес.

Суммарный эффект обоих методов внутривнутрибрюшинной биотерапии составил 77,5 %.

Таблица

Клиническая эффективность внутривнутрибрюшинной ИЛ-2/аллогенной ЛАК и ИЛ-2-иммунотерапии у больных раком яичников с опухолевым асцитом

Эффективность	ИЛ-2/аллоген.ЛАК (n=23)	ИЛ-2 (n=17)	Всего (n=40)
Полная регрессия	11 (47,8 %)	4 (23,5 %)	15 (37,5 %)
Частичная регрессия	8 (34,8 %)	8 (47,1 %)	16 (40,0 %)
Общий ответ	19 (82,6 %)	12 (70,6 %)	31 (77,5 %)
Без эффекта	4 (17,4 %)	5 (29,4 %)	9 (22,5 %)

Следует отметить, что после проведения курса адоптивной внутривнутрибрюшинной иммунотерапии у 20 (50 %) больных раком яичников из обеих групп наблюдалось снижение в крови уровня СА-125. Исследование показало эффективность предложенного метода внутривнутрибрюшинной биотерапии при опухолевых асцитах у больных, страдающих диссеминированным раком яичников. Клинические данные получили лабораторное подтверждение: в процессе иммунотерапии из экссудата не определялись опухолевые клетки, проходя стадию дегенерации (вакуолизация цитоплазмы и ядер) на фоне увеличения в асцитической жидкости активированных лимфоцитов по типу иммунобластов.

Цитотоксическая активность аллогенных ЛАК против аутологических опухолевых клеток возрастала в среднем с 35 до 56 %. Принципиальным положительным моментом является возможность проведения 2 или 3 линий ХТ после эффективной внутривнутрибрюшинной биотерапии в виде регрессии канцероматоза брюшины и асцита.

Практически у всех пациенток внутривнутрибрюшинная биотерапия сопровождалась повышением температуры тела (максимальный подъем до 38,5–39,0 °С) и ознобом (в основном – при ИЛ-2/аллоген ЛАК-иммунотерапии). Как правило, реакция гипертермии у больных появлялась уже после первого введения иммуномодуляторов.

Повышение температуры наступало, обычно, через 3–4 ч после введения и наблюдалось в течение нескольких часов. Реакция купировалась приемом внутрь 0,5 г парацетамола.

Выводы

Внутрибрюшинная биотерапия опухолевых асцитов у больных раком яичников характеризуется высокой эффективностью: объективный эффект при ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии достигнут у 82,6 % и при ИЛ-2-иммунотерапии у 70,6 % больных с удовлетворительной переносимостью и отсутствием гематологической токсичности. При цитологическом исследовании экссудата в конце лечения у большинства больных опухолевые клетки отсутствовали, что и подтверждалось клиническим эффектом.

Литература

1. Киселевский М.В., Блюменберг А.Г. Адоптивная иммунотерапия рака яичников. – Сборник статей, приуроченный к Европейской школе по онкологии. – 2001. – С. 164–76.
2. Вакурова Е.С. Лапароскопия в комплексной диагностике и оценке эффективности лечения рака яичников. – Дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2005. – 156 с.
3. Гарин А.М., Базин И.С. Десять наиболее распространенных злокачественных опухолей: Монография. – М.: МАКС Пресс, 2010. – 2-е изд. – 384 с.
4. Давыдов М.И., Летьгин В.П., Кузнецов В.В. Рак яичников. В кн.: Опухоли женской репродуктивной системы. – М.: Радуга, 2007. – С. 273–82.
5. Давыдов М.И., Оразгельдыев К.Р., Волков С.М., Киселевский М.В. Адоптивная иммунотерапия опухолевых плевритов / Новое в онкологии: Сб. научных трудов. – М., 2001. – Выпуск 5. – С. 72–88.
6. Тюляндин С.А. Рак яичников: химиотерапия второй линии // Практическая онкология. – 2000. – № 4. – С. 32–7.
7. Beecham J.B., Kucera P., Helmkamp B.F., Bonfiglio T.A. Peritoneal angiogenesis in patients with ascites // Gynecol Oncol. – 1983. – 15. – P. 142.
8. Fastaia J., Dumont A.E. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis // J. Natl. Cancer Inst. – 1976. – 56(3). – P. 547–50.
9. Feedman R.S., Kudelka A.P., Kavanagh J.J. Clinical and Biological Effects of Intraperitoneal Injections of Recombinant Interferon- γ and Recombinant Interleukin-2 with or without Tumor-infiltrating Lymphocytes in Patients with Ovarian or Peritoneal Carcinoma // Clin. Cancer Res. – 2000. – 6. – P. 225–6.
10. Garrison R.N., Vaclín L.D., Galloway R.H., Heuser L.S. Malignant ascites. Clinical and experimental observations // Ann Surg. – 1986. – 203. – P. 644–65.
11. Hirabayashi K., Graham J. Genesis of ascites in ovarian cancer // Am J. Obstet Gynecol. – 1970. – 106 (4). – P. 492–7.
12. Liu X., Li D., Zhang C. et al. Treatment of 121 patients with malignant effusion due to advanced lung cancer by intrapleural transfer of autologous or allogenic LAK cells combined with rIL-2 // Med Sci J. – 1993. – 8. – P. 186–9.
13. Markman M. Intraperitoneal chemotherapy of ovarian cancer // Semin. Oncol. – 1998. – 25. – P. 356–60.
14. Nagamine I., Yamaguchi Y., Ohara M. et al. Induction of gamma delta T-cells using zoledronate plus interleukin-2 in patients with metastatic cancer/ Hiroshima J. Med. Sci. – 2009. – 58. – P. 37–44.
15. Pujade-Lauraine E., Guastella J.P., Colombo N. et al. Intraperitoneal recombinant interferon- γ in ovarian cancer patients with residual disease at second-look laparotomy // J. Clin. Oncol. – 1996. – 14. – P. 343–50.
16. Hua Z., Lit J. Clinical study on immunotherapy of ovarian cancer with tumor infiltrating lymphocytes // Chung Hua Fu. – 1996. – 13. – P. 555–7.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ» (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

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.

(продолжение см. на стр. 59)

УДК 615.277.3-099:616-006.6-092.9

*Н.А. Пятаев, П.И. Скопин, О.В. Минаева, С.А. Шукин, Е.Ю. Коровина, Н.Н. Зырняева***ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ДОКСОРУБИЦИНА
ПРИ ВВЕДЕНИИ В ФОРМЕ КОНЬЮГАТА С ДНК
У КРЫС С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМОЙ РС-1***ГОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева», Саранск***Контактная информация***Пятаев Николай Анатольевич, д-р мед. наук, заведующий лабораторией таргетной фармакотерапии***адрес:** 430005, Республика Мордовия, г.Саранск, ул. Большевистская, д. 68; **тел.** +7(8342)47-67-63;**e-mail:** pyataevna@mail.ru

Статья поступила: 14.10.2010, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Цель работы – изучить характер тканевого распределения доксорубицина при его введении в форме конъюгата с нативной ДНК и исследовать эффективность комплекса ДНК-доксорубицин у крыс с перевитой холангиоцеллюлярной карциномой РС-1. Выполнены эксперименты на крысах с перевитой холангиоцеллюлярной карциномой РС-1. Животные были разделены на 6 групп. В контрольной группе животные лечения не получали. Животным 1-й опытной группы вводили доксорубицин в дозе 1 мг/кг внутривенно, животным 2-й; 3-й и 4-й – конъюгат доксорубицина с ДНК (препарат «Деринат», ЗАО «Техномедсервис», Россия) в дозах 1; 2 и 4 мг/кг соответственно, животным 5-й опытной группы – только «Деринат». Исследовали тканевое распределение доксорубицина после инъекции и ряд показателей, характеризующих эффективность и токсичность химиотерапии: индекс массы опухоли; индекс торможения роста опухоли; летальность в процессе лечения; число лейкоцитов и тромбоцитов периферической крови, частоту токсической энтеропатии и миокардиодистрофии. Установлено, что введение доксорубицина в форме конъюгата с нативной ДНК изменяет характер распределения препарата. Регистрируется преимущественное накопление доксорубицина в тканях с высокой митотической активностью (опухолевой и лимфоидной ткани) на фоне снижения плазменной концентрации и концентрации в паренхиматозных органах. Показано, что конъюгированная с ДНК форма доксорубицина обладает несколько меньшей антибластной активностью, но в эквивалентных по противоопухолевому эффекту дозах реже вызывает миокардиодистрофию и энтеропатию по сравнению с изолированным препаратом.

Ключевые слова: комплекс ДНК-доксорубицин, химиотерапия, кардиотоксичность, распределение, Деринат.

*N.A. Pyataev, P.I. Skopin, O.V. Minaeva, S.A. Tshchukin, E.J. Korovina, N.N. Zyrnyaeva***TISSUE DISTRIBUTION AND ANTICANCER ACTIVITY
OF DNA-CONJUGATED DOXORUBICINE
IN RATS WITH TRANSPLANTED CARCINOMA RS-1***N.P. Ogarev Mordovian State University, Saransk***Resume**

The purpose of this study was the investigation of doxorubicin-DNA conjugate tissue distribution and efficiency of this drug form at treatment of cholangiocellular carcinoma PC-1 in rats. Experiments were carried out on rats with transplanted cholangiocellular carcinoma PC-1. Animals were divided into 6 groups prior to the experiment. In the control group, animals were received distilled water using the same schedule. In the first experimental group, 1 mg/kg of doxorubicin was injected intraperitoneally. In the 2, 3 et 4 experimental groups, doxorubicin-DNA («Derinat», Tehnomedservis, Russia) conjugate was injected at the 1, 2 and 4 mg/kg. In the last group animals were injected the «Derinat» only. We have studied the tissue distribution of the doxorubicin and several other parameters of chemotherapy efficiency. We have followed the lethality, the tumor mass index, the number of leucocytes in blood, the rate of gastrointestinal tract ulcers. We have found that injection of doxorubicin in the conjugated form changes the tissue distribution of the drug in compare to poor doxorubicin. The doxorubicin is accumulated in tissues with high mitotic activity (tumor and lymphoid tissues). At the same time the concentration of drug in blood and parenchymatous organs was decreased. We have shown that DNA-conjugated form of doxorubicin has smaller antineoplastic activity than pure doxorubicin. We have also found that the side effects of the DNA-doxorubicin conjugate is much lower than for pure drug.

Keywords: DNA-doxorubicin complex, chemotherapy, cardiotoxicity, distribution, Derinat.

Введение

Проблема избирательности противоопухолевой химиотерапии является одной из наиболее актуальных в современной онкофармакологии. Принципиальный путь ее решения – направленный транспорт химиопрепаратов с помощью специфических векторов, обладающих тропностью к опухолевым клеткам. В качестве последних используются разнообразные

химические соединения, каким-либо образом избирательно поглощающиеся опухолевыми клетками [6; 8; 10]. Наше внимание привлек препарат нативной ДНК – Деринат (ЗАО «Техномедсервис», Россия). Главной особенностью метаболизма и кинетики препарата, позволяющей использовать его в качестве вектора для доставки химиопрепаратов к опухолевым клеткам, является выявленный факт избирательного накопления экзогенной ДНК в опухолевой ткани [5].

В исследованиях, проводимых с использованием меченного ^3H -тимидином Дерината, было установлено, что концентрация радионуклида в опухоли и лимфоузлах после внутрибрюшинного введения препарата была в 5–7 раз выше, чем в плазме и ткани паренхиматозных органов [5; 10]. Высказывается мнение, что фрагменты молекулы ДНК, имеющие размер 50–120 нм, поглощаются клетками путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Кроме того, в литературе имеются сведения о создании конъюгатов ряда противоопухолевых химиопрепаратов с ДНК *in vitro* [1; 2; 9–12]. В качестве таких препаратов были использованы доксорубин и карминомицин. В работах Ю.П. Вайнберга и Д.Ю. Мельникова [1–3] показано, что при экстракорпоральном взаимодействии Дерината с доксорубином и карминомицином в среде, содержащей альбумин, образуются устойчивые к диссоциации в водной среде комплексы, причем связь химиопрепаратов с молекулой ДНК носит нековалентный характер.

Данные исследования послужили основанием для разработки методики лечения рака молочной железы, желудка и толстой кишки [4]. Однако следует отметить, что до настоящего времени не проводилось исследований кинетики и распределения, не установлена эффективная терапевтическая доза химиопрепаратов при их введении в форме конъюгатов с ДНК. Данные обстоятельства и послужили причинами проведения настоящего исследования.

Цель работы – изучить характер тканевого распределения доксорубина при его введении в форме конъюгата с нативной ДНК и исследовать эффективность комплекса ДНК-доксорубин у крыс с перевитой холангиоцеллюлярной карциномой PC-1.

Материалы и методы

Выполнены эксперименты на 72 лабораторных крысах линии Vistar. Животным по достижении массы 80–100 г под кожу передней брюшной стенки перевивали штамм холангиоцеллюлярной карциномы PC-1.

Животные были разделены на 6 групп, по 12 особей в каждой. В контрольной группе животные лечения не получали. В опытных группах на 7-й день после перевивки начинали лечение.

Животным 1-й опытной группы вводили доксорубин («Teva», Израиль) в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно; животным 2; 3 и 4 опытных групп – конъюгат доксорубина с Деринатом из расчета соответственно 1; 2 и 4 мг/кг конъюгированного доксорубина, в 5-й – Деринат (ЗАО «Техномедсервис», Россия) в дозе 7,5 мг/кг (доза, соответствующая дозе Дерината во 2–4-й опытных группах). Инъекции производились 1 раз в 3 дня. На 21 сутки после начала лечения животных умерщвляли через 30 мин после инъекции препаратов. В 1 и 2 опытных группах исследовали характер тканевого распределения доксорубина.

Приготовление конъюгата Дерината с доксорубином осуществляли по методике Д.Ю. Мельникова [3] в собственной модификации. В стерильных условиях смешивали 2 мл водного раствора доксорубина (12 мг/мл) и 1 мл 10%-ного человеческого сывороточного альбумина. Инкубировали 30 мин при 4 °С и непрерывном шейкении, затем добавляли 2 мл 1,5%-ного Дерината, продолжали инкубацию в тех же условиях в течение 60 мин. Свободный доксорубин удаляли диализом ацетатным буфером с pH 4,5. Для определения ко-

личества конъюгированного доксорубина последний экстрагировали изопропанолом при 42 °С в течение 60 мин, после чего раствор нагревали до 60 °С, затем центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин, надосады отбирали и определяли в нем концентрацию препарата. Степень конъюгации доксорубина составляла 60–70 %.

В эксперименте определение концентрации доксорубина производили в плазме крови, опухолевой ткани, ткани печени, почек, легких, в лимфоузлах, кишечной стенке и в мышечной ткани. Для исследований использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (хроматограф «Милихром 5-3», Россия), анализ выполняли по методике [7]. Параметры хроматографирования: детектор ультрафиолетовый, $\lambda=254$ нм, колонка KAX-5, сорбент – нуклеосил C18, подвижная фаза – ацетонитрил + фосфатный буфер с pH 4,5 ($v : v = 70 : 30$).

Во всех группах определяли показатели, характеризующие эффективность химиотерапии: индекс массы опухоли (отношение массы опухоли к массе тела животного); индекс торможения роста опухоли (иТРО), рассчитываемый по формуле:

$$иТРО = \frac{(M_k - M_o)}{M_k} \times 100, \text{ где}$$

M_k и M_o – средняя масса опухоли соответственно в контрольной и опытных группах.

Для оценки токсичности исследовали летальность в процессе лечения, определяли число лейкоцитов и тромбоцитов периферической крови, проводили морфологическое исследование желудка, кишечника, печени, почек, легких и миокарда.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента и критерия χ^2 . Критический уровень значимости различий принимался равным 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Тканевые концентрации определяли в 1 и 2 опытных группах, где вводимые дозы доксорубина были эквивалентны. Результаты определения представлены на рис. 1.

В 1 опытной группе характер распределения препарата был относительно равномерным. В ткани опухоли концентрация препарата была равна $0,290 \pm 0,023$ мкг/г, что составило 75 % от плазменной концентрации.

Наиболее высокие концентрации регистрировались в хорошо васкуляризованных тканях – в легких, печени, почках и миокарде ($0,572 \pm 0,051$; $0,842 \pm 0,031$ и $0,647 \pm 0,029$ мкг/г соответственно). Примечательно, что не было выявлено повышения концентрации доксорубина в тканях с высокой митотической активностью клеток – лимфоузлах и селезенке. Концентрация исследуемой субстанции в этих тканях составила $0,421$ – $0,582$ мкг/г ткани соответственно.

Во 2 опытной группе регистрировалось преимущественное накопление препарата в быстрорастущих и регенерирующих тканях, причем в большей степени в лимфоидной и опухолевой ткани и в меньшей – в кишечной стенке. В опухоли концентрация превышала плазменную в 5,5 раза и достигала $0,959$ мкг/г. В лимфоидной ткани содержание доксорубина составляло $0,815 \pm 0,021$, в ткани селезенки – $0,727 \pm 0,040$ мкг/г.

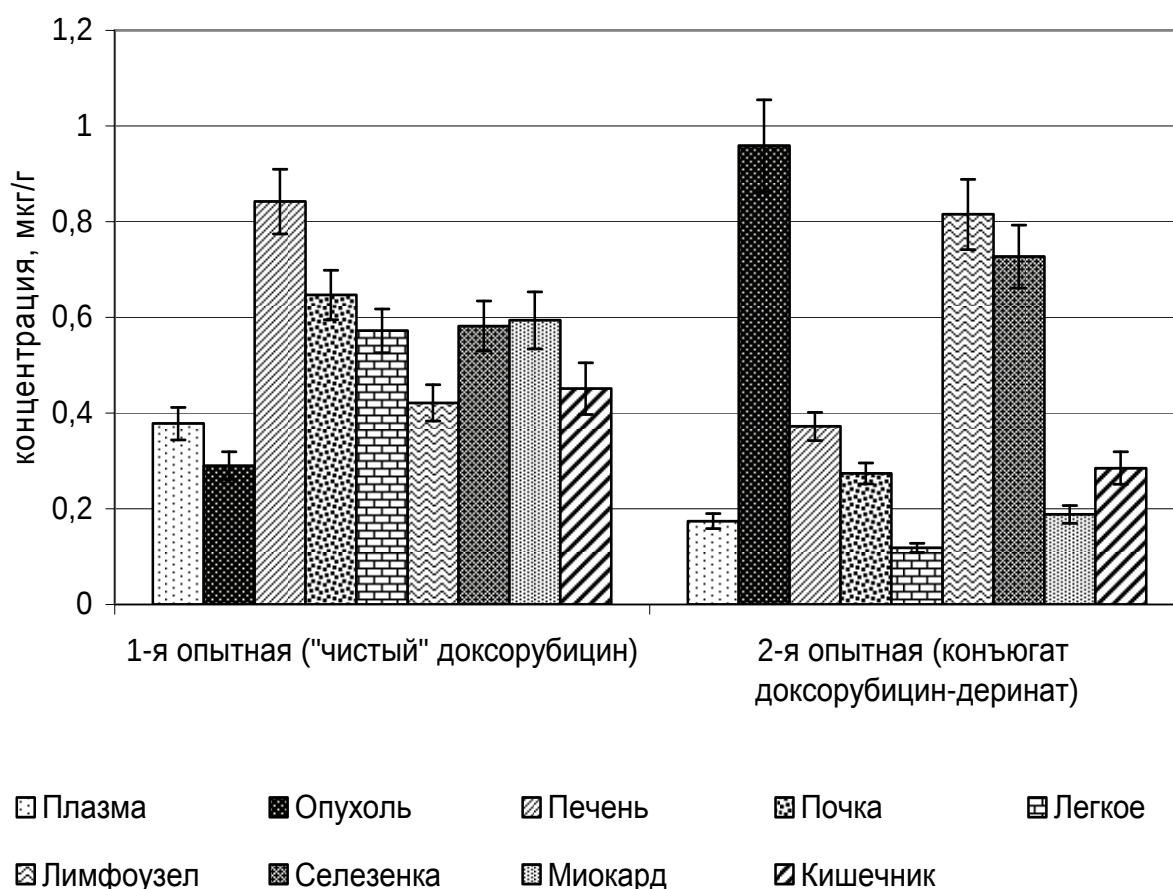
При этом плазменная концентрация и концентрация доксорубина в паренхиматозных органах была в среднем в 2–2,5 раза ниже, чем в 1 опытной группе; разница же концентраций в миокарде составила почти 300 % ($0,594 \pm 0,021$ и $0,188 \pm 0,011$ соответственно). При этом плазменная концентрация и концентрация доксорубина в паренхиматозных органах была в среднем в 2–2,5 раза ниже, чем в 1 опытной группе; разница же концентраций в миокарде составила почти 300 % ($0,594 \pm 0,021$ и $0,188 \pm 0,011$ соответственно). Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что введение доксорубина в виде конъюгата с ДНК меняет характер распределения препарата. Тканевое распределение препарата в данном случае практически полностью соответствует распределению меченых нуклеотидов, полученному в исследовании [5] при введении экзогенной ДНК.

Это свидетельствует о достаточно прочной связи доксорубина с ДНК и отсутствии значимой диссоциации комплекса доксорубин-ДНК до момента поглощения клетками.

Учитывая, что условия экстракции вещества из тканей *in vitro* значительно отличаются от таковых *in vivo*, закономерно возникает вопрос, происходит ли расщепление комплекса доксорубин-ДНК после поступления в клетку и сохраняется ли антибластная эффективность доксорубина после конъюгации с ДНК?

Этот вопрос стал предметом второй части нашего исследования, в которой была изучена антибластная активность и токсичность доксорубина и его конъюгатов с ДНК.

Результаты исследования антибластной активности приведены в табл. 1.



(Рис. 2. см. вклейка)

Рис. 1. Тканевое распределение доксорубина в исследуемых группах. Для всех исследованных тканей различия между группами достоверны.

Таблица 1

Противоопухолевая активность различных схем терапии

Группа сравнения	Значения показателей в группах	
	ИМО	ИТРО
Контрольная	44,1 $\pm$ 3,1*	–
1 опытная («чистый» доксорубин)	18,5 $\pm$ 1,4**	66,4 $\pm$ 4,8
2 опытная (конъюгат доксорубин-деринат, 1 мг/кг)	32,1 $\pm$ 2,2***	30,4 $\pm$ 1,9*
3 опытная (конъюгат доксорубин-деринат, 2 мг/кг)	20,2 $\pm$ 2,7***	69,2 $\pm$ 3,4
4 опытная (конъюгат доксорубин-деринат, 4 мг/кг)	7,8 $\pm$ 0,8***	432,7 $\pm$ 22,1*
5 опытная (деринат)	48,1 $\pm$ 3,7*	5,8 $\pm$ 0,6

* достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного во 2-й опытной группе;

** достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного в контрольной группе.

Исследуемый штамм карциномы PC-1 проявил достаточную чувствительность к доксорубину:

В 1 опытной группе («чистый» доксорубин в дозе 1 мг/кг) иТРО составил 66,4 %. Активность конъюгированной формы препарата была несколько меньшей и возрастала с увеличением дозы. Во 2 опытной группе (конъюгированный доксорубин в дозе 1 мг/кг) иТРО был равен 30,4 %, что на 54 % меньше показателя 1 опытной группы. Противоопухолевый эффект, эквивалентный эффекту «чистого» препарата, достигался при использовании дозы конъюгата 2 мг/кг (3 опытная группа). иТРО в данной группе был равен 69,2% и достоверно не отличался от такового в 1 опытной группе.

Конъюгированный доксорубин в дозе 4 мг/кг (4 опытная группа) имел максимально выраженный эффект (иТРО=432 %), который, однако, в 100 % случаев сопровождался тяжелыми токсическими реакциями.

Деринат в виде монотерапии (5 опытная группа) не оказывал влияния на опухолевый рост. На рис. 2 приведены фотографии опухолей средних размеров для каждой из исследованных групп.

Анализ побочных и токсических эффектов химиотерапии показал, что встречаемость и выраженность осложнений при ее проведении различалась в сравниваемых группах (табл. 2).

Таблица 2

Побочные эффекты различных схем терапии

Группы сравнения	Значения показателей в группах					
	Летальность, абс. (%)	Лейкоциты, $\times 10^9$, $M \pm m$	Тромбоциты, $\times 10^9$, $M \pm m$	Язвенный энтероколит, абс. (%)	Токс. миокардиодистрофия, абс. (%)	Токс. дистрофия печени, абс. (%)
Контрольная	0	18,9 $\pm$ 1,6**	318 $\pm$ 19**	0	0	0
1 опытная («чистый» доксорубин)	2 (16,7)*	9,4 $\pm$ 0,8*	116 $\pm$ 11*	5 (41,7)*	4 (33,3)*	1 (8,3)*
2 опытная (конъюгат доксорубин-деринат, 1 мг/кг)	0	15,3 $\pm$ 1,1**	231 $\pm$ 14**,**	0	0	0
3 опытная (конъюгат доксорубин-деринат, 2 мг/кг)	1 (8,3)*	11,5 $\pm$ 0,9*	152 $\pm$ 16*	2 (16,7)*,**	2 (16,7)*,**	0
4 опытная (конъюгат доксорубин-деринат, 4 мг/кг)	7 (58,3)*	2,7 $\pm$ 0,1***	40,4 $\pm$ 2,2***	12 (100)*,**	12 (100)*,**	12 (100)*,**
5 опытная (деринат)	0	17,1 $\pm$ 1,8**	326 $\pm$ 15**	0	0	0
*достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного в контрольной группе; **достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного во 2-й опытной группе.						

При введении «чистого» доксорубина у всех животных регистрировалась лейкопения ($(9,4 \pm 0,8) \times 10^9$ /л против $(18,9 \pm 1,6) \times 10^9$ /л в контроле, $p < 0,05$), язвенные поражения кишечника встречались в 42 % наблюдений, у 4 (33 %) животных имелись морфологические признаки токсической миокардиодистрофии. Всего в процессе лечения пало 2 (16,7 %) животных (причина – язвенно-некротический энтероколит). Во 2 опытной группе частота побочных эффектов ХТ была значительно меньшей. Летальных исходов в данной группе не регистрировалось, количество лейкоцитов в периферической крови достоверно не отличалось от такового в контроле, морфологических изменений со стороны внутренних органов не наблюдалось. В 3 опытной группе отмечался 1 летальный исход, у выживших животных преобладали токсические эффекты со стороны

крововетворной системы – лейко-, тромбоцитопения и анемия, однако их выраженность была меньшей, чем при использовании «чистого» доксорубина. Частота язвенного поражения кишечника и миокардиодистрофии составляла 16 %, что почти в 2 раза меньше, чем в 1 опытной группе. В 4 опытной группе частота и выраженность токсических эффектов ХТ была наибольшей. Летальность в процессе терапии составила 58 %. На секции у 4 павших животных обнаружен язвенно-некротический энтероколит, у 3 – выраженные дистрофические изменения во всех внутренних органах (печени, почках, миокарде). У выживших отмечалась тяжелая миелосупрессия (лейкоцитов – $2,7 \pm 0,1 \times 10^9$ /л, тромбоцитов – $40,4 \times 10^9$ /л), в 100 % случаев обнаруживались язвы кишечника и регистрировались морфологические проявления гепатопатии и миокардиодистрофии.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют: эффективные дозы доксорубина при введении в виде конъюгата отличаются от таковых при использовании изолированной субстанции. Эквивалентная по противоопухолевой активности доза конъюгированного доксорубина была примерно в 2 раза выше дозы чистого препарата. Наиболее вероятным объяснением является неполная диссоциация комплекса доксорубин-ДНК в клетке. Вместе с тем, конъюгированная форма доксорубина в эффективной дозе вызывала достоверно меньше побочных эффектов. При этом токсичность была пропорциональна степени накопления в тех или иных тканях. Так, у конъюгата, который слабо аккумулируется в миокарде и паренхиматозных органах, значительно уменьшались ulcerогенность и кардиотоксичность. Миелосупрессии, особенно в отношении тромбоцитарного ростка, также была выражена меньше. Проведенные исследования продемонстрировали возможность повышения избирательности действия доксорубина при введении в виде конъюгата с гетерологичной ДНК и показали перспективность проведения исследований в этом направлении.

Литература

1. Вайнберг Ю.П. Физико-химические и биологические свойства комплекса ДНК с карминомицином // Медицина. – 1980. – № 9. – С. 18–22.
2. Вайнберг Ю.П., Носик Д.Н., Каплина Э.Н. и др. Активность лекарственных средств, полученных на основе нативной ДНК в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов // Ж. Медицина. – 1995. – № 6. – С. 3–5.
3. Мельников Д.Ю. Применение иммуноконъюгатов в химиотерапии онкологических больных // Медицинская картотека. – 1999. – № 7–8. – С. 28–32.
4. Патент России № 20049721993, 1994.
5. Русинова Г.Г. Особенности усвоения экзогенной ДНК и ее низкомолекулярных предшественников в организме животных // Биохимия. – 1971. – Т. 36, № 5. – С. 88–9.
6. Северин Е.С. Исследование эффективности различных белковых векторов в рецептор-опосредованном транспорте биологически активных веществ в клетки // Информационный бюллетень РФФИ. – 1995. – Т.3, № 4. – С. 303.
7. European pharmacopoeia 5.0. – 2005. – P. 1481–2.
8. Baurain R., Deprez-De Campeneere D., Zenebergh A., Trouet A. Plasma levels of doxorubicin after IV bolus injection and infusion of the doxorubicin-DNA complex in rabbits and man. Comparison with free doxorubicin // Cancer Chemother Pharmacol. – 1982. – 9(2). – P. 93–6.
9. Brown I., Ward H.W. The comparative toxicity and therapeutic efficacy of adriamycin and the adriamycin-DNA complex in the chemotherapy of C3H mice with transplanted mammary adenocarcinoma // Cancer Lett. – 1977. – 2(4–5). – P. 227–32.
10. Deprez-De Campeneere D., Baurain R., Huybrechts M., Trouet A. Comparative study in mice of the toxicity, pharmacology, and therapeutic activity of daunorubicin-DNA and doxorubicin-DNA complexes // Cancer Chemother Pharmacol. – 1979. – 2(1). – P. 25–30.
11. Hall S.W., Benjamin R.S., Burgess M.A. et al. Doxorubicin-DNA complex: a phase I clinical trial // Cancer Treat Rep. – 1982. – 66(12). – P. 2033–7.
12. Severin S.E. Antitumor activity of conjugates of the oncofetal protein, alpha-fetoprotein and phthalocyanines in vitro // Biochemistry and Molecular Biology International. – 1997. – 43(4). – P. 873–81.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ» (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

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.*

(продолжение см. на стр. 60)

Выводы

1. У крыс с перевитой карциномой РС-1 введение доксорубина в форме конъюгата с нативной ДНК изменяет характер распределения препарата. Регистрируется преимущественное накопление доксорубина в тканях с высокой митотической активностью (опухолевой и лимфоидной ткани) на фоне снижения плазменной концентрации и концентрации в паренхиматозных органах.
2. Конъюгированная с ДНК форма доксорубина обладает меньшей антибластомной активностью по сравнению с изолированным препаратом, но оказывает меньшее токсическое воздействие на желудочно-кишечный тракт и миокард. Эквивалентная по противоопухолевой активности доза конъюгированного доксорубина в два раза выше, чем доза «чистого» препарата.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ» (ОКОНЧАНИЕ)

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

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

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

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

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

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

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

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

*Зейналова К.Р., Степанова Е.В.***МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РМЖ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ HER-2***Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва***Контактная информация***Зейналова Камала Руфатовна, врач-онколог отделения химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей***адрес:** 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-96-80;**e-mail:** kamka80@yahoo.com, e_stepanova@nm.ru

Статья поступила: 14.10.2010, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Проведено исследование значения молекулярно-биологических маркеров для характеристики HER-2 положительного (HER-2(+)) рака молочной железы. Показано, что высокая экспрессия VEGF коррелирует со значительным уменьшением медианы времени до прогрессирования (с 28,6 до 16,6 мес; $p=0,039$) и длительности достигнутого эффекта (с 28,9 до 18,5 мес; $p=0,028$) при I линии лечения таксанамы + Трастузумаб HER-2(+) метастатического РМЖ. Высокая и умеренная экспрессия Bcl-2 при метастатическом HER-2(+) РМЖ ассоциируется с увеличением времени до прогрессирования болезни ($p=0,0001$; $r, r_s=0,54$). Высокая пролиферативная активность опухоли ($ki67 \geq 40\%$), высокая экспрессия Топо2а, высокая экспрессия S100A4, высокая и умеренно выраженная экспрессия pAkt в опухоли больных метастатическим HER-2(+) РМЖ ассоциируются с уменьшением медианы длительности эффекта на I линии лечения ($p < 0,05$ для каждого изученного маркера).

Маркерами, которые могут быть использованы для отбора больных с неблагоприятным прогнозом и, возможно, требующих новых подходов в лечении при метастатическом HER-2(+) РМЖ, являются: гиперэкспрессия VEGF, Ki67, Топо2а, pAkt, S100A4, отсутствие гиперэкспрессии Bcl-2.

Ключевые слова: рак молочной железы, HER-2(+), Трастузумаб, VEGF, Ki67, Топо2а, pAkt, S100A4.*Zaynalova K.P., Stepanova E.V.***MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS
METASTATIC BREAST CANCER-OVEREXPRESSING HER-2***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

The study of molecular biological markers significance for the characterization of the HER-2 positive (HER-2 (+)) breast cancer. It is shown that high expression of VEGF is correlated with a significant decrease in median time to progression (from 28.6 mon to 16.6 mon; $p = 0.039$) and the duration of the achieved effect (from 28.9 mon to 18.5 mon; $p = 0.028$) for first-line HER-2 (+) metastatic breast cancer treatment with taxanes plus Trastuzumab. High and moderate expression of Bcl-2 in metastatic HER-2 (+) breast cancer is associated with increased time to disease progression ($p = 0.0001$; $r, r_s = 0.54$). High proliferative activity of tumors ($ki67 > 40\%$), high expression Topo2a, high expression of S100A4, high and moderate expression of pAkt in tumors of patients with metastatic HER-2(+) breast cancer are associated with a decrease in median duration of effect for the first-line treatment ($p < 0.05$ for each studied marker).

Overexpression of VEGF, Ki67, Topo2a, pAkt, S100A4, the absence of overexpression of Bcl-2 can be used to select patients with poor prognosis and may require new approaches in the treatment of metastatic HER-2(+) breast cancer.

Key words: breast cancer, HER-2(+), Trastuzumab, VEGF, Ki67, Topo2a, pAkt, S100A4.**Введение**

Рак молочной железы с гиперэкспрессией HER-2 представляет собой заболевание с достаточно агрессивным фенотипом. Амплификация и/или гиперэкспрессия HER-2 ассоциируется с повышенной клеточной пролиферацией, инвазивностью, усиленным ангиогенезом, сниженным апоптозом опухолевых клеток и, как следствие, высоким потенциалом метастазирования. Гиперэкспрессия HER-2 [1] является независимым прогностическим фактором более частого развития метастазов в головной мозг (~ в 25–53 % случаев). Гиперэкспрессия HER-2 является независимым прогностическим фактором повышенного риска рецидива заболевания, снижения общей выживаемости [2–4], а также предсказательным фактором снижения эффективности химиотерапии и эндокринотерапии [5–8]. Гиперэкспрессия HER-2 в опухолевой клетке часто коррелирует также с рядом других

неблагоприятных факторов прогноза, в частности часто отсутствием экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в опухоли [4]. Хотя были определены ряд генов и молекулярных механизмов, которые являются мишенями HER-2, биологические основы агрессивности опухолей, гиперэкспрессирующих данный белок, остаются до конца не изученными. Исследования с использованием генных микрочипов показали только небольшое количество генов, экспрессия которых прямо сопряжена с активностью HER-2 при РМЖ, по разным данным 19–40 [8]. Также наблюдается снижение экспрессии 4–10 генов, обратно ассоциированных с гиперэкспрессией HER-2. Амплификация и/или гиперэкспрессия HER-2 коррелирует с мутацией p53, отрицательным РЭА, отсутствием Bcl, гиперэкспрессией TGF- α , гиперэкспрессией EGFR (HER-1), гиперэкспрессией HER-3 и гипоекспрессией HER-4, гиперэкспрессией COX-2, амплификацией топоизомеразы II α (Топо2а), c-kit [9–14].

В нашей работе изучена широкая панель молекулярно-биологических маркеров (Bcl-2, MUC4, Ki67, pAkt, PTEN, EGFR, Торо2а, VEGF, и S100A4), характеризующих или ассоциированных с пролиферацией, апоптозом, ангиогенезом и метастазированием у больных метастатическим РМЖ с гиперэкспрессией HER-2. Проведено сопоставление полученных результатов с клиническим течением болезни (частотой объективного эффекта, временем до прогрессирования, выживаемостью). В период с 2003 по 2010 гг. в исследование было включено 37 больных метастатическим HER-2(+) РМЖ, получивших в I линии лечения ХТ таксанами (Паклитакселом или Доцетакселом) в комбинации с Трастузумабом. Диагноз РМЖ подтверждался морфологически – на основании гистологического исследования. Гиперэкспрессия HER-2 подтверждена во всех случаях на основании иммуногистохимического исследования или FISH (в случае экспрессии HER-2 при ИГХ на 2+). Характеристика больных представлена в табл. 1.

37 больных в I линии лечения в сочетании с Трастузумабом получили 3-12 циклов химиотерапии на основе таксанов в монорежиме (Паклитаксел/Доцетаксел) или в комбинации с препаратами платины (Паклитаксел/Доцетаксел + Карбоплатин), винкаалкалоидами (Паклитаксел + Винорельбин) с последующим продолжением монотерапии Трастузумабом до прогрессирования болезни.

У всех больных метастатическим HER-2(+) РМЖ, включенных в исследование, выполнен анализ экспрессии молекулярно-биологических маркеров, их ассоциации с различными клинико-морфологическими особенностями опухоли и прогнозом течения заболевания.

Изучение маркеров проводилось ИГХ методом в первичной опухоли (биопсийном или операционном гистологическом материале, полученном до начала I линии лечения).

Характеристика маркеров дана в табл. 2.

Таблица 1

Клиническая и морфологическая характеристика больных (n=37)

Характеристика	n (%)
Возраст, годы диапазон медиана	29 – 77 54
Менопауза да нет	24 (64,9) 13 (35,1)
Гистологический вариант (инфильтративный рак) протоковый дольковый смешанный (протоковый+дольковый)	29 (78,4) 2 (5,4) 6 (16,2)
Степень злокачественности II III	29 (78,4) 8 (21,6)
Гормонально-рецепторный статус отрицательный (РЭ-/РП-) положительный (РЭ+ или РП+)	19 (51,4) 18 (48,6)
HER-2 статус 3+ 2+/FISH+	29 (78,4) 8 (21,6)
Локализация отдаленных метастазов висцеральные (печень, легкие) невисцеральные (мягкие ткани, кости) смешанные (висцеральные + невисцеральные)	9 (24,3) 15 (40,5) 13 (35,2)

Таблица 2

Панель использованных в исследовании антител

Маркер	Клон	Фирма	Характеристика
Ki-67	MIB-1	Dako	Пролиферативная активность опухоли
Bcl-2	124	Dako	Ингибитор апоптоза
EGFR	31G7	Zymed	Рецептор эпидермального фактора роста I типа
pAkt	Phosphor T308	Abcam	Антиапоптотический белок
PTEN	VP-P985	Vector	Индуктор апоптоза
MUC4	1G8	Santa Cruz Biotech	Супрессор апоптоза
Торо2а	Ki-S1	Dako	Фермент, влияющий на топологию ДНК, чувствительность к антрациклинам
VEGFR	C-1	Santa Cruz Biotech	Стимулятор ангиогенеза
S100A4	8828MTS	Нидерланды	Индуктор метастазирования опухоли

Иммуногистохимический метод Определения молекулярно-биологических маркеров в опухоли

Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДТО РОНЦ. Используемые в работе диагностические антитела даны в табл. 2. Критерии оценки результатов соответствовали принятым в лаборатории и мировой практике.

Оценка эффекта

Результаты противоопухолевого лечения оценивали в соответствии со стандартными REGIST критериями. Анализировали частоту объективного эффекта, время до прогрессирования и показатели выживаемости. Статистический анализ проводили с использованием программы "SPSS" (v13.0. for Windows). Расчет выживаемости проводили методом Каплан-Мейер. Сравнение 2 кривых выживаемости проводили с помощью логранкового критерия.

Результаты

Частота объективного эффекта (ПР + ЧР) составила 67,6%; контроль болезни (ПР + ЧР + СБ $\geq$ 6 мес.) достигнут в 94,6% случаев.

Медиана длительности эффекта составила 18,3+ мес. (6,3÷57,4).

При медиане наблюдения 23,3 мес. прогрессирование болезни после I линии лечения отмечено у 24/37 больных. Медиана времени до прогрессирования составила 19,1 мес. (2,9÷57,4; табл. 3).

Медиана общей выживаемости не достигнута, так как на момент анализа 23/37 больных живы, продолжают лечение и наблюдение.

Оценка экспрессии 6 молекулярно-биологических маркеров (Ki67, Bcl-2, MUC4, pAkt, Торо2а и S100A4) выполнена у 37 больных, еще 3 молекулярно-биологических маркеров (VEGF, PTEN, EGFR) – у 36 больных.

Данные по частоте экспрессии маркеров приведены в табл. 4.

Таблица 3

Эффективность I линии лечения больных метастатическим HER-2(+) раком молочной железы (n=37)

Показатель	Эффективность
Общий эффект (ПР + ЧР), n больных (%)	25 (67,6)
Стабилизация ($\geq$ 6 мес.), n больных (%)	10 (27)
Контроль болезни (ПР + ЧР + СБ $\geq$ 6 мес.), n больных (%)	35 (94,6)
по невисцеральным метастазами	13
по висцеральным метастазами	4
по смешанным метастазами	18
Ранее прогрессирование (< 6 мес.), n больных (%)	2 (5,4)
Медиана времени до прогрессирования, мес.	19,1
1-летняя общая выживаемость, %	97,3
2-летняя общая выживаемость, %	67,6

Таблица 4

Экспрессия молекулярно-биологических маркеров в ткани первичной опухоли у больных метастатическим HER-2(+) раком молочной железы.

Маркер	n больных	Частота экспрессии маркера n (%)		
		Высокая (+)	Умеренная (+/-)	Низкая/отсутствие (-)
Ki-67	37	19 (51,4)	9 (24,3)	9 (24,3)
Bcl-2	37	12 (32,4)	6 (16,2)	19 (51,4)
PTEN	36	20 (55,6)	9 (25)	7 (19,4)
VEGF	36	11 (30,5)	10 (27,8)	15 (41,7)
MUC4	37	22 (59,5)	4 (10,8)	11 (29,7)
pAkt	37	19 (51,4)	–	18 (48,6)
Торо2а	37	15 (40,6)	10 (27)	12 (32,4)
EGFR	36	3 (8,3)	3 (8,3)	30 (83,4)
S100A4	37	24 (64,9)	8 (21,6)	5 (13,5)

Наиболее часто при метастатическом РМЖ с гиперэкспрессией HER-2 обнаружена:

- высокая пролиферативная активность (Ki67 $\geq$ 40%) – в 51,4% случаев;
- высокая экспрессия PTEN – в 55,6% случаев (и 55,6% случаев умеренная экспрессия PTEN);
- высокая экспрессия MUC4 – в 59,5% случаев;
- высокая экспрессия S100A4 – в 64,9% случаев;
- отсутствие экспрессии EGFR – в 83,4% случаев.

Выполнен анализ корреляции экспрессии между различными молекулярными маркерами.

Высокая пролиферативная активность опухоли – экспрессия Ki-67 в $\geq$ 40% ядер HER-2(+) опухолевых

клеток – имела прямую взаимосвязь с высокой экспрессией Торо2а (p=0,035; r, r_s=0,45) и гиперэкспрессией MUC4 (p=0,049; r, r_s=0,40). Высокая + умеренно выраженная экспрессия PTEN прямо коррелировала с высокой экспрессией Торо2а (p=0,0001; r, r_s=0,70); и высокая экспрессия PTEN наблюдалась в опухоли с высокой экспрессией pAkt (p=0,018; r, r_s=0,45).

Выявлена прямая корреляция между гиперэкспрессией VEGF и Торо2а (p=0,043; r, r_s=0,44), S100A4 (p=0,014; r, r_s=0,52). Отмечена прямая взаимосвязь между гиперэкспрессией MUC4 и Торо2а (p=0,007; r, r_s=0,45), pAkt (p=0,038; r, r_s=0,37).

А также прямая корреляция наблюдалась между высокой экспрессией S100A4 и высокой экспрессией VEGF (p=0,014; r, r_s=0,52). Установлена корреляция экспрессии некоторых молекулярных маркеров с клинико-морфологическими характеристиками.

При гиперэкспрессии РЭ в опухоли достоверно чаще наблюдалась высокая + умеренная экспрессия Bcl-2 (в 73,3%), чем при негативных РЭ (31,8%) ($p=0,020$; r , $r_s=0,41$). РЭ(+) опухоли по сравнению с РЭ(-) достоверно чаще имели высокий метастатический потенциал (высокая экспрессия S100A4) – 86,7 против 50% ($p=0,035$; r , $r_s=0,38$).

Ни у одной из 15 больных с РЭ(+) не отмечена гиперэкспрессия EGFR, тогда как при анализе данных 21 больного с РЭ(-) гиперэкспрессия EGFR отмечена в 28,6% наблюдений ($p=0,030$; r , $r_s=-0,38$).

В опухоли больных с количеством зон метастазирования больше 2 по сравнению с таковыми больных с минимальным (1-2) количеством зон метастазирования достоверно чаще наблюдалась высокая экспрессия S100A4 – 85,7 против 37,5% случаев ($p=0,005$; r , $r_s=0,5$; рис. 3) и более часто выявлялась высокая экспрессия VEGF – 60 против 18,2% случаев ($p=0,051$; r , $r_s=0,42$).

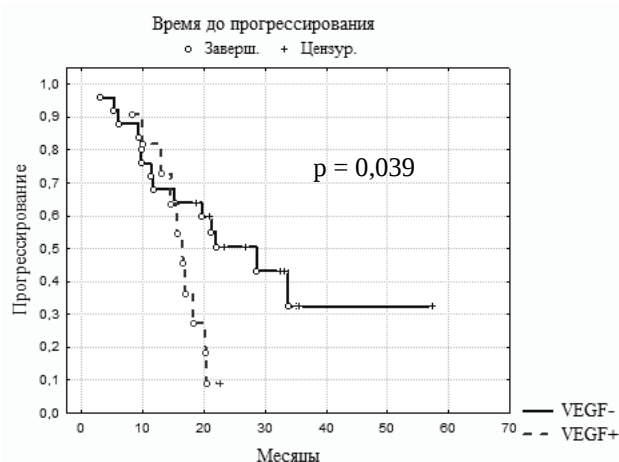


Рис. 1. Время до прогрессирования после лечения таксанами + Трастузумабом в зависимости от экспрессии VEGF.

Медиана продолжительности эффекта при I линии химиотерапии таксаны + Трастузумаб была достоверно ниже у больных:

- с высокой экспрессией VEGF в опухоли – 16,6 мес. (95 %-ный ДИ 14,2–19,0), по сравнению с умеренно выраженной + отсутствием/низкой экспрессией VEGF в опухоли 23,3 мес. (95 %-ный ДИ 15,4–31,2; $p=0,0002$);
- с высоким пролиферативным индексом опухоли – Ki67 $\geq 40\%$ 18,5 мес. (95 %-ный ДИ 17,6–19,4), нежели с умеренно выраженной + отсутствием/низкой экспрессией Ki67 в опухоли 28,9 мес. (95 %-ный ДИ 14,4–43,4; $p=0,028$);
- с высокой экспрессией Торо2а 18,9 мес. (95 %-ный ДИ 18,1–19,8), по сравнению с отсутствием/низкой экспрессией маркера в опухоли 28,9 мес. (95 %-ный ДИ 23,3–34,6) ($p=0,0063$);
- с высокой + умеренно выраженной экспрессией pAkt 18,4 мес. (95 %-ный ДИ 17,3–19,5), по сравнению с отсутствием/низкой экспрессией pAkt в опухоли 22,1 мес. (95 %-ный ДИ 16,7–27,5; $p=0,032$);

При анализе показателей эффективности лечения в зависимости от экспрессии молекулярно-биологических маркеров выявлен ряд закономерностей.

Медиана времени до прогрессирования на I линии ХТ таксанами + Трастузумабом у больных с относительно низкой экспрессией VEGF(-) составила 28,6 мес. (95 %-ный ДИ 15,0–42,2) и значительно меньше был период до прогрессирования – 16,6 мес. (95 %-ный ДИ 14,0–19,2) при VEGF(+) ($p=0,039$; рис. 1).

Выявлена тенденция к различию времени до прогрессирования на I линии химиотерапии + Трастузумаб в зависимости от уровня Bcl-2 в опухоли.

Медиана времени до прогрессирования у больных с Bcl-2(-) (с нормальной экспрессией) опухолью составила 15,7 мес. (95 %-ный ДИ 11,8–19,6) и 28,6 мес. (95 %-ный ДИ 13,1–44,2) у Bcl-2(+) пациентов (с высокой + умеренной экспрессией; $p=0,061$; рис. 2).

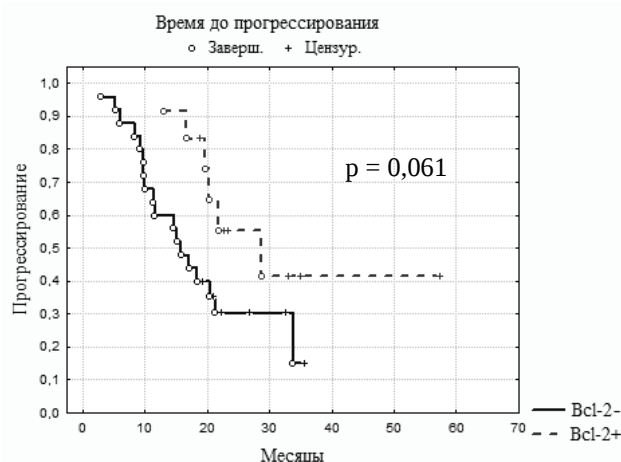


Рис. 2. Время до прогрессирования после лечения таксанами + Трастузумабом в зависимости от экспрессии Bcl-2.

- с высоким метастатическим потенциалом опухоли – S100A4 18,9 мес. (95 %-ный ДИ 17,8–20,0), нежели с отсутствием/низкой экспрессией S100A4 в опухоли 26,7 мес. (95 %-ный ДИ 16,8–36,6) ($p=0,028$).

У больных из группы со временем до прогрессирования болезни на I линии таксанами в комбинации с Трастузумабом ≥ 1 года по сравнению с больными из группы со временем до прогрессирования < 1 года достоверно чаще наблюдалась высокая экспрессия Bcl-2 – в 44,4 против 0% случаев ($p=0,015$; r , $r_s=0,42$), высокая + умеренная экспрессия Bcl-2 – в 66,7 против 0% случаев ($p=0,0001$; r , $r_s=0,59$; рис. 3).

Обсуждение

Больные HER-2 позитивным РМЖ имеют неблагоприятный общий прогноз и наиболее быстрое рецидивирование болезни на всех стадиях развития РМЖ.

Значительным достижением является выделение HER-2(+) РМЖ, что обеспечивает рациональное и высокоэффективное лечение в этой группе больных. Наибольший эффект достигается при использовании Трастузумаба в добавлении к ХТ.

О влиянии уровня других молекулярно-биологических маркеров на непосредственную эффективность и отдаленные результаты лечения больных РМЖ с гиперэкспрессией HER-2, в том числе маркеров, влияющих на эффективность терапии с включением Трастузумаба, на сегодняшний день **не сформировано** единого мнения.



Рис. 3. Время до прогрессирования после I линии лечения с Трастузумабом и экспрессия Bcl-2.

Известно, что гиперэкспрессия HER-2 является предиктивным фактором снижения эффективности эндокрино- и ХТ. Существуют неоднозначные данные относительно снижения эффективности ХТ, в частности – таксанами. В нашей работе показана высокая эффективность химиотерапии I линии на основе таксанов в комбинации с Трастузумабом в лечении больных метастатическим HER-2(+) РМЖ: общий эффект составил 67,6% при медиане длительности эффекта 18,3+ мес., медиана времени до прогрессирования составила 19,1+ мес.

Нами изучено значение уровня экспрессии молекулярно-биологических маркеров в течении болезни этих больных.

Гиперэкспрессия VEGF встречается особенно часто в клетках опухоли молочной железы с гиперэкспрессией HER-2 и ассоциируется с усиленным ангиогенезом и возможно обуславливает резистентность к Трастузумабу. По результатам нашего исследования высокая экспрессия VEGF (при значимом окрашивании $\geq 25\%$ опухолевых клеток) в HER-2(+) опухоли больных метастатическим РМЖ показала свою предсказательную значимость и достоверно ($p=0,039$) влияла на значительное уменьшение времени до прогрессирования – 16,6 мес. по сравнению с 28,6 мес. у больных с нормальной экспрессией маркера. Неблагоприятная предсказательная значимость с тенденцией к статистической достоверности в отношении времени до прогрессирования на I линии химиотерапии таксанами в комбинации с Трастузумабом обнаружена также для Ki67 ($p=0,064$; r , $r_s=0,39$) и Торо2а ($p=0,083$; r , $r_s=0,34$). Время до прогрессирования больных с высокой экспрессией Ki67 (с индексом $\geq 40\%$) и Торо2а (≥ 4 баллов по интенсивности окрашивания + количеству окрашенных клеток) составляет < 2 лет.

А высокая + умеренная экспрессия ингибитора апоптоза Bcl-2 (при окрашивании цитоплазмы $> 1\%$ опухолевых клеток) с высокой степенью достоверности коррелировала с более длительным временем до прогрессирования (≥ 1 года) по сравнению с больными с Bcl-2– опухолью, имевших время до прогрессирования < 1 года ($p=0,0001$; r , $r_s=0,54$).

Факторами короткой продолжительности эффекта, достигнутого на I линии химиотерапии таксанами + Трастузумаб, явились: высокая пролиферативный индекс Ki67– 16,6 мес. против 23,3 мес. ($p=0,0002$); высокая экспрессия фактора неблагоприятного прогноза болезни Торо2а – 18,9 мес. против 28,9 мес. ($p=0,0063$); высокая + умеренная экспрессия антиапоптотического белка, обуславливающего резистентность к Трастузумабу, pAkt (при окрашивании высокой интенсивности опухолевых клеток на 2+ и 3+) – 18,4 мес. против 22,1 мес. ($p=0,032$); высокая экспрессия индуктора метастазирования опухоли S100A4 (при значимом окрашивании $\geq 25\%$ опухолевых клеток) – 18,9 мес. против 26,7 мес. ($p=0,028$), а также высокая экспрессия VEGF – 18,5 мес. против 28,9 мес. ($p=0,028$).

Дополнительно мы изучили уровень экспрессии других маркеров. В достаточно высоком проценте случаев наблюдалась гиперэкспрессия в опухоли факторов и благоприятного, и неблагоприятного прогноза болезни. Так, большинство опухолей обладали высокой пролиферативной активностью – Ki67 $\geq 40\%$, что возможно и обуславливает высокую частоту быстрого и значительного ответа опухоли на лечение, полученную в нашей работе. Гиперэкспрессия индуктора апоптоза PTEN, высокий уровень которого по литературным данным коррелирует с высокой непосредственной эффективностью терапии на основе Трастузумаба, нами наблюдалась в 80,6% случаев. Гиперэкспрессия индуктора метастазирования S100A4, свидетельствующая о высоком метастатическом патенциале HER-2 позитивного РМЖ, отмечена в 86,5% опухолей. Гиперэкспрессия супрессора апоптоза, отвечающего за неблагоприятный исход болезни, резистентность к Трастузумабу, присутствовала в опухоли большинства (70,3%) наших больных. В 83,4% наблюдений в опухоли отсутствовала гиперэкспрессия фактора, снижающего эффективность Трастузумаба, EGFR, что возможно объясняет высокие результаты лечения больных Трастузумабом в нашей работе.

Также проведен подробный анализ экспрессии молекулярно-биологических маркеров в опухоли больных, имевших выраженный эффект (ПР + ЧР + СБ ≥ 6 мес., время до прогрессирования ≥ 2 лет) и не имевших эффекта (ПРГ + СБ < 6 мес. или время до прогрессирования < 6 мес.) на I линии химиотерапии в комбинации с Трастузумабом. Замечено, что в случае эффекта опухоль имела низкий пролиферативный индекс, отличалась гиперэкспрессией маркеров благоприятного исхода болезни и чувствительности к Трастузумабу – Bcl-2 и PTEN, отсутствием повышенной экспрессии маркеров агрессивного течения болезни и резистентности к Трастузумабу – VEGF, Торо2а и MUC4, pAkt, EGFR.

Заключение

Полученные комплексные данные об экспрессии молекулярно-биологических маркеров при HER-2(+) раке молочной железы в сопоставлении с результатами лечения таксанами и Трастузумабом являются приоритетными в характеристике HER-2(+) РМЖ и вносят значительные знания в развитие системы рационального лечения.

Работа поддержана Советом по грантам Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых – докторов наук и государственным контрактом с Федеральным агентством по науке и инновациям № 02.512.12.2009 от 25 июня 2008 г.

Литература

1. Gabos Z., Sinha R., Hanson J. et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. – J. Clin. Oncol. – 2006;24:5658–63.
2. M.D. Anderson Cancer Center. Early stage, HER2-positive breast cancer patients at increased risk of recurrence. Cancer Newline Audio Podcast Series November 2009.
3. Kallioniemi O.P., Holli K., Visakorpi T. et al. Association of c-erbB-2 protein overexpression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis, and poor long-term survival in breast cancer. – Int. J. Cancer – 1991; 49:650–5.
4. Ross J.S., Fletcher J.A. The Her-2/neu Oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. – Stem Cells – 1998, 16: 413–28.
5. Jukkola A., Bloigu R., Soini Y. et al. c-erbB-2 positivity is a factor for poor prognosis in breast cancer and poor response to hormonal or chemotherapy treatment in advanced disease. – Eur. J. Cancer – 2001;37:347–54.
6. Carlomagno C., Perrone F., Gallo C. et al. CerebB2 overexpression decreases the benefit of adjuvant Tamoxifen in early-stage breast cancer without ancillary lymph node metastases. – J. Clin. Oncol. – 1996;14:2702–8.
7. Ferrero-Pou's M., Hacène K., Bouchet C. et al. Relationship between cerebB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. – Clin. Cancer Res. – 2000;6:4745–54.
8. Степанова Е.В., Загрекова Е.И., Ермилова В.Д. и др. Молекулярно-биологические маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы I – II стадии. – Архив патологии – 2003,3: 14–7.
9. Beenken S.W., Grizzle W.E., Crowe D.R. et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: Coexpression of c-erbB-2 and p53. – Ann. Surg. – 2001;233:630–8.
10. Piccart M., Lohrisch C., Di Leo A. et al. The predictive value of HER2 in breast cancer. – Oncology 2001;61(suppl 2):73–82.
11. Ristimäki A., Sivula A., Lundin J. et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. – Cancer Res. 2002;62:632–5.
12. Suo Z., Risberg B., Kalsson M.G. et al. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. – J. Pathol. 2002;196:17–25.
13. Tsutsui S., Ohno S., Murakami S. et al. Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer. – Am. J. Surg. – 2003; 185:165–7.
14. Umekita Y., Ohi Y., Sagara Y. et al. Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- α predicts worse prognosis in breast-cancer patients. – Int. J. Cancer 2000; 89:484–7.

Информационное письмо № 1

III Всероссийская научная конференция с международным участием «Наноонкология», САРАТОВ, 6–7 СЕНТЯБРЯ 2011 г.

Глубокоуважаемые коллеги!

Нанотехнологическое общество России,
Российская академия медицинских наук, РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН,
Российская академия наук,
Министерство промышленности и энергетики Саратовской области,
Саратовский научный центр РАН,
Учреждение Российской академии наук,
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН),
ГОУ ВПО Саратовский Государственный Университет имени Н.Г. Чернышевского,
ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
6–7 сентября 2011 года проводят

III Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Наноонкология»

Адрес проведения конференции: г. Саратов, проспект Энтузиастов 13. ИБФРМ РАН.

как доехать: от ж/д вокзала до ИБФРМ РАН:

марш. такси №№ 55А, 63 и 79 около 30 мин. до остановки «ул. Пензенская»

или от ж/д вокзала до остановки «проспект Кирова» (5 остановок): трол. № 15, марш. такси №№ 79, затем - авт. №№ 2, 2А, 6, 90, марш. такси №№ 21, 62, 83, 99 около 40 мин. до остановки «ул. Пензенская»

Расположение ИБФРМ РАН, вокзала и остановок транспорта можно посмотреть на интерактивной карте. Также на карте представлены основные достопримечательности г. Саратова и другая полезная информация.

Председатель Оргкомитета: зам. директора РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН,
директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

доктор медицинских наук, профессор

Барышников Анатолий Юрьевич

Сопредседатель Оргкомитета – директор ИБФРМ РАН

доктор химических наук, профессор

Щеголев Сергей Юрьевич

Секретарь Оргкомитета: **Решетникова Вера Владимировна** тел.: 324-55-85,
8-926-505-72-55, 8-905-523-72-06.

Зам. секретаря Оргкомитета: Шубина Ирина Жановна тел.: 8-910-434-68-81

факс: (495) 324-22-74, E-mail: nanoconference2011@rambler.ru

(продолжение см. на стр. 71)

УДК 547.979.733:535.37

*Н.И. Казачкина¹, А.А. Панкратов¹, Р.И. Якубовская¹, В.М. Негримовский²***ИНДУКЦИЯ ПРОТОПОРФИРИНА IX В ТКАНЯХ МЫШЕЙ
ПРИ НАРУЖНОМ ПРИМЕНЕНИИ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ
В СОСТАВЕ ВОДНЫХ ГЕЛЕЙ**¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва²Федеральное государственное унитарное предприятие «ГНЦ "НИОПИК"», Москва**Контактная информация***Казачкина Наталья Ивановна, старший научный сотрудник***адрес:** 125284, Москва, 2-ой Боткинский пр., д. 3; **тел.** +7(916)320-48-64;**e-mail:** nnioi_nkaz@mail.ru

Статья поступила: 27.08.2010, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Работа посвящена изучению распределения в тканях животных протопорфирина IX (ППИХ), индуцированного 5-аминолевулиновой кислотой, при ее накожном применении в составе гидрогелей на различных основах (хитозана, карбопола и гидроксиэтилцеллюлозы) с целью разработки готовой лекарственной формы АЛК. Исследование проведено на мышцах с опухолью Эрлиха и здоровых кроликах методом локальной флуоресцентной спектроскопии.

Показано, что АЛК в составе гидрогелей индуцировала синтез ППИХ в тканях в зоне аппликации. С увеличением экспозиции с 1 до 4 ч и концентрации АЛК в геле с 5 до 20 % интенсивность флуоресценции ППИХ в опухоли возрастала. Введение ДМСО в гелевую композицию приводило к более равномерному распределению индуцированного ППИХ в опухоли. АЛК в составе гидрогелей обладала способностью проникать через роговой слой кожи и всасываться в кровь животных.

При разработке лекарственной формы АЛК для наружного применения был выбран гидрогель на основе ГЭЦ с 20 %-ным содержанием АЛК и добавлением ДМСО, отличающийся наибольшей стабильностью биологических свойств при хранении.

Ключевые слова: протопорфирин IX, 5-аминолевулиновая кислота, АЛК, индуцированная флуоресценция.*N.I. Kazachkina¹, A.A. Pankratov¹, R.I. Yakubovskaya¹, V.M. Negrimovskiy²***PROTOPORPHYRINE IX INDUCTION
IN MURINE TISSUES BY TOPICAL APPLICATION OF 5-AMINOLEVULINIC ACID
IN THE HYDROGELS**¹Moscow Hertsen Research Institute of Oncology²State Scientific Center «Institute of Organic Intermediates and Dyes», Moscow**Abstract**

The aim of the research was to develop dosage form of 5-aminolevulinic acid (ALA) as a hydrogel composition based on chitosan, carbopol, or hydroxyethylcellulose (HEC). Distribution of protoporphyrine IX (PPIX) in animal tissues was studied by using local fluorescence spectroscopy in mice bearing Ehrlich tumour and healthy rabbits.

We have shown that ALA when included in hydrogel compositions induced PPIX synthesis in the application area tissues. The intensity of PPIX fluorescence in the tumor was time- (1–4 h) and dose-dependent (5–20 %). The PPIX distribution in the tumor was more even when DMSO was introduced into gel composition. We observed that ALA as a component of hydrogel penetrated through *stratum corneum* and appeared in animal blood.

Based on data obtained, we conclude that HEC-based gel with ALA and DMSO was most stable gel and might be chosen for the development of ALA dosage form for topical application.

Key words: protoporphyrine IX, δ -aminolevulinic acid, hydrogel, induced fluorescence.**Введение**

АЛК является предшественником гема, на одном из заключительных этапов синтеза которого образуется протопорфирин IX (ППИХ). Последний обладает флуоресцентными и фотосенсибилизирующими свойствами и способен накапливаться в опухоли в больших количествах, чем в окружающих тканях, что позволяет применять его для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии опухолей [13].

ФД и ФДТ с 5-аминолевулиновой кислотой (АЛК) зарекомендовали себя как эффективные методы диагностики и лечения ряда злокачественных и доброкачественных опухолей и неонкологических заболеваний [11; 14].

Индукция ППИХ под действием АЛК происходит при любом способе ее применения: системном, внутрисполостном, ингаляционном, аппликационном [13]. В последнем случае используются водно-масляные эмульсии [3; 17], мази [1], гели [4–6; 9; 10; 15].

В настоящее время использующиеся аппликационные формы АЛК (мази) готовятся *ex tempore*. Известны также составы АЛК на основе гелей [12; 16], стабильность которых невысока: через 200 дней хранения при +5 °С сохраняется менее 45 % активной субстанции [12]. АЛК является гидрофильным соединением. В литературе имеются данные о более эффективной индукции синтеза ППИХ при применении водных растворов АЛК по сравнению с липидсодержащими составами [8].

В то же время влияние того или иного гелеобразующего вещества в растворе АЛК на индукцию синтеза ППХ в тканях не изучено, тогда как это было бы полезно при применении лекарственных форм АЛК на основе гидрогелей, приготовленных *ex tempore*.

Настоящая работа посвящена изучению распределения в тканях животных ППХ, индуцированного АЛК, при ее накожном применении в составе водных гелей на различных основах, с целью разработки готовой лекарственной формы АЛК.

Материалы и методы

Исследования проведены с применением АЛК-содержащих водных гелей на основе хитозана, карбопола или гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ). Концентрация АЛК в гелях составляла 5; 10 или 20 %.

В качестве подопытных животных были использованы здоровые кролики-самцы породы «Шиншилла» и мыши обоего пола BDF₁ или CBF₁, самки, с опухолью Эрлиха. Животные получены из питомников РАМН «Моникино» и «Андреевка».

Опухоль Эрлиха прививали мышам по 0,1 мл разведенной вдвое асцитической жидкости. Эксперименты проводили на 9–10 дни роста опухоли.

За 10–20 минут до начала аппликации животных седировали: кролики получали внутривенно 10 мг реланиума или 5 мг дроперидола, мыши – внутривенно 20 мг/кг реланиума или 10 мг/кг дроперидола.

АЛК-содержащие гели в количестве 0,1 мл (5, 10 или 20 мг АЛК при ее 5%, 10% или 20% концентрации в геле соответственно) наносили на предварительно эпилированные участки кожи и накрывали полиэтиленовой пленкой. Через различные промежутки времени остатки геля удаляли и измеряли флуоресценцию тканей методом локальной флуоресцентной спектроскопии.

Измерения флуоресценции кожи кроликов проводили *in vivo*.

Для проведения флуоресцентного анализа тканей мышей забивали дислокацией шейных позвонков, извлекали образцы кожи, внутренних органов и опухоль. Высоту опухоли измеряли циркулем-измерителем.

На момент проведения исследования она составляла ~6 мм. Опухоль разрезали на три части, при этом плоскость среза проходила «параллельно» коже. Измерения флуоресценции производили на каждом срезе опухоли.

Для регистрации свечения использовалась компьютеризованная спектрально-флуоресцентная диагностическая установка «Спектр-Кластер» (ООО «Кластер», Россия). Флуоресценцию возбуждали излучением твердотельного лазера с удвоением частоты (λ генерации – 532 нм).

Регистрируемый спектр являлся суммой спектров эндогенной (фоновой) флуоресценции тканей и флуоресценции индуцированного после введения АЛК эндогенного порфирина IX.

При математической обработке интегральную интенсивность регистрируемого спектра флуоресценции в диапазоне максимума флуоресценции ППХ (λ 620–650 нм) нормировали на интегральную интенсивность аутофлуоресценции тканей в диапазоне 555–585 нм [2], полученную величину обозначили как Дф (диагностический спектрально-флуоресцентный параметр) и использовали для оценки интенсивности индуцированной флуоресценции (ИФ).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента. Достоверными считали отличия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

После накожной аппликации АЛК-содержащих гелей на различных основах в спектрах флуоресценции тканей животных появлялась полоса с двумя максимумами – на 635 и 705 нм, что характерно для ППХ.

В табл. 1 и 2 представлена данные по кинетике накопления ППХ в тканях мышей при применении гелей на основе карбопола и гидроксиэтилцеллюлозы.

Как видно из таблиц, интенсивность ИФ возрастала с увеличением времени аппликации. Достоверные отличия Дф от фоновых величин зарегистрированы в коже через 2 ч, в опухоли – через 4 ч после начала аппликации, где специфическая флуоресценция ППХ обнаруживалась на глубине до 6 мм при применении всех использованных гелевых композиций (см. табл. 2–4).

Сразу после 4-часовой аппликации ИФ обнаруживалась не только в зоне наложения гелей, но и во внутренних органах и отдаленных от зоны наложения гелей участках кожи (см. табл. 1). Это указывает на то, что АЛК из водных гелей проходит через роговой слой кожи и поступает в общий кровоток.

При нанесении гелей на отдаленный от зоны опухолевого роста участок кожи, ИФ опухоли по форме спектра и значениям Дф не отличалась от фоновой. Следовательно, можно предположить, что накопление ППХ в глубоких слоях опухоли обусловлено в значительной мере проникновением АЛК через кожу, а не ее поступлением из кровотока.

Включение ДМСО в состав геля приводило к увеличению синтеза протопорфирина в коже мышей, что было заметно через 2 ч после начала аппликации (табл. 2), то есть приводило к более быстрому прохождению АЛК через роговой слой и достижению базального слоя, где и происходит синтез протопорфирина IX. На последующие сроки наблюдения интенсивность индуцированной флуоресценции в тканях животных сравнивалась.

В опухолях статистически достоверных различий в интенсивности сигналов флуоресценции, индуцированной образцами геля, содержащими и не содержащими ДМСО, не обнаружено. Однако в первом случае наблюдалась тенденция к повышению интенсивности ИФ и более равномерное распределение индуцированного ППХ. Так, после 4-часовой аппликации разница в среднем уровне Дф в различных слоях опухоли мышей, получавших гель с ДМСО, составляла 0,4 отн. ед., а без ДМСО – 0,9–1,4 отн. ед. (см. табл. 2).

При уменьшении концентрации АЛК в геле вне зависимости от его основы интенсивность индуцированной флуоресценции в глубоких слоях опухоли также снижалась, оставаясь практически постоянной на коже и в поверхностных слоях опухоли (см. табл. 4).

Полученные результаты коррелируют с данными литературы. Так, A. Casas et al. методом автордиографии показали, что АЛК из водно-солевого раствора при его наружном применении проникает в аденокарциному молочной железы мыши, привитую подкожно на глубину до 5 мм. При этом более высокое содержание АЛК было обнаружено в поверхностном слое опухоли толщиной 2 мм [8].

Таблица 1

Распределение индуцированного ППХ в тканях мышей с опухолью Эрлиха при применении АЛК в составе геля на основе карбопола в зависимости от времени аппликации*

Ткань	Дф, отн. ед.			
	Фон	1 ч	2 ч	4 ч
Опухоль	1,6±0,2	1,8±0,2	2,5±0,6**	4,8±2,8**
Кожа со стороны эпидермиса	1,0±0,1	1,5±0,1**	2,5±0,7**	3,1±0,9**
Кожа со стороны дермы	1,0±0,1	1,6±0,3**	2,1±0,2**	2,1±0,3**
Мышца	1,6±0,4	1,4±0,2	1,6±0,1	1,5±0,2
Печень	2,2±0,1	4,6±1,8**	7,2±2,9**	4,9±1,3**
Желчный пузырь	1,6±0,1	1,9±0,4	2,9±1,7**	6,7±4,8**
Почки	1,6±0,2	3,5±0,9**	3,3±0,4**	2,8±0,2**

*концентрация АЛК в геле составляла 20%;

**достоверно отличаются от фоновых величин.

Таблица 2

Распределение индуцированного ППХ в тканях мышей с опухолью Эрлиха при применении АЛК в составе геля на основе гидроксицеллюлозы в зависимости от времени аппликации и наличия ДМСО в составе композиции*

Ткань		Дф, отн. ед.						
		Фон	1 ч		2 ч		4 ч	
			Содержание ДМСО, %					
			0	5	0	5	0	5
Опухоль	Среднее	1,6±0,2	1,7±0,1	1,4±0,1	2,3±0,5	2,3±0,3	4,5±2,1	5,1±0,8
	На глубине 0–2 мм		1,9±0,1	1,5±0,1	2,9±1,2	2,7±0,3	4,9±2,0	4,9±1,1
	На глубине 4–6 мм		1,5±0,2	1,4±0,1	1,8±0,2	1,6±0,5	4,0±3,2	5,3±1,0
Кожа над опухолью	Со стороны эпидермиса	1,1±0,1	1,4±0,1	1,6±0,3	2,1±0,1**	2,7±0,2**	3,7±0,3	3,0±0,8
	Со стороны дермы	0,9±0,1	1,1±0,1	1,4±0,1	1,7±0,1	2,0±0,4	2,6±0,4	2,4±0,4

*концентрация АЛК в геле составляла 20%

**достоверно отличаются между собой

Таблица 3

Распределение ППХ, индуцированного АЛК, при ее местном применении в составе гелей на различных основах в тканях мышей с опухолью Эрлиха*

Ткань		Дф, отн. ед.			
		Фон	Через 4 ч после аппликации		
			Хитозан	Карбопол	ГЭЦ
Опухоль	Среднее	1,6±0,2	3,7±0,4	7,0±1,8	6,7±1,0
	На глубине 0–2 мм		4,3±0,9	8,7±1,9	9,3±1,6
	На глубине 4–6 мм		3,4±2,0	5,8±1,4	6,1±1,5
Кожа со стороны эпидермиса		1,0±0,1	3,2±0,3	3,1±0,9	4,3±0,3
Кожа со стороны дермы		1,0±0,1	3,0±0,02	2,1±0,3	3,5±0,1
Кожа уха		1,1±0,1	2,2±0,7	1,7±0,3	2,6±0,3
Мышца		1,6±0,4	2,0±0,2	1,5±0,2	2,7±0,9
Печень		2,2±0,1	9,0±3,8	4,9±1,3	8,0±2,6
Желчный пузырь		1,6±0,1	17,1±6,5	6,7±4,8	28,2±10,5
Почки		1,6±0,2	3,8±1,1	2,8±0,2	4,9±0,4

*концентрация АЛК в гелях составляла 20%

Таблица 4

Распределение индуцированного ППХ в опухоли Эрлиха при использовании гелей с различным содержанием АЛК через 4 часа после начала аппликации

Гелеобразующее вещество	Ткань		Дф, отн. ед.		
			Концентрация АЛК в геле, %		
			5	10	20
Карбопол	Кожа		3,6±1,2	4,0±1,3	4,4±1,4
	Опухоль	На глубине 1–2 мм	6,8±2,8	7,6±2,9	7,4±2,8
		На глубине 4–6 мм	2,0±0,5	2,9±0,3	5,4±1,5
ГЭЦ	Кожа		–	3,6±0,4	4,3±0,5
	Опухоль	На глубине 1–2 мм	–	7,5±0,8	8,0±1,9
		На глубине 4–6 мм	–	3,3±0,2	5,7±1,3

Введение ДМСО в раствор, содержащий АЛК, приводило к незначительному увеличению накопления АЛК в коже и верхнем слое опухоли. В другой работе этих же авторов методом хроматографии было установлено, что при накожной аппликации водно-солевого раствора АЛК индукция порфиринов происходит не только в месте аппликации, но и во внутренних органах и в отдаленных участках кожи. При нанесении АЛК на контрлатеральный участок кожи в карциноме молочной железы мыши продукция порфиринов была существенно ниже, чем при ее аппликации на кожу в зоне роста опухоли [7]. При исследовании зависимости накопления индуцированных порфиринов в тканях от дозы авторы также не получили разницы в концентрации общих порфиринов в коже при применении АЛК в количестве от 10 до 40 мг/мышь [7]. Суммируя данные литературы и результаты настоящего исследования можно заключить, что поведение индуцированного протопорфирина IX при аппликационном применении АЛК в водных растворах сходно: наличие того или иного полимера принципиально не влияет на распределение индуцированного РРiX в организме мышей. Так, АЛК в составе водных гелей на основе хитозана, карбопола или ГЭЦ при их нанесении на кожу в зоне роста опухоли Эрлиха приводила к синтезу порфиринов в коже и опухоли. С увеличением времени аппликации с 1 до 4-х часов в зоне нанесения геля интенсивность флуоресценции РРiX в тканях возрастала. Распределение АЛК индуцированного РРiX в опухолевой ткани у мышей после 4-х часов аппликации гелей на карбополовой и гидроксипропилцеллюлозной основах зависела от концентрации АЛК в составе композиции: значения Дф в глубоко залегающих участках опухоли были существенно выше при использовании геля с 20 %-ным содержанием АЛК, чем с 10 %-ным или 5 %-ным.

В то же время наблюдались некоторые отличия в действии гелей, приготовленных на различных основах. Так, при применении геля на основе хитозана в опухоли наблюдалась тенденция к снижению интенсивности ИФ по сравнению с гелями на основе карбопола или ГЭЦ (см. табл. 3).

В опытах, проведенных на здоровых кроликах, было выявлено, что гели на основе хитозана и карбопола со значением рН, равным 6,5–7,0 и не имеющие ДМСО в своем составе, оказывали местнораздражающее действие.

При включении ДМСО в состав нейтральных карбополовых композиций или использовании более кислых гелей на основе карбопола и ГЭЦ местных тканевых реакций не наблюдалось.

Литература

1. Новикова Е.Г., Соколов В.В., Сидорова И.С., Чулкова Е.А. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия фоновых и предраковых заболеваний вульвы с применением 20% мази «Аласенс» // Российский онкологический журнал. – 2009. – № 2. – С. 12–6.
2. Соколов В.В., Филоненко Е.В., Телегина Л.В. и др. Комбинация флуоресцентного изображения и локальной спектрофотометрии при флуоресцентной диагностике раннего рака гортани и бронхов // Квантовая электроника. – 2002. – № 11. – С. 963–9.
3. Ackermann G., Abels C., Bäuml W. et al. Simulations on the selectivity of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in vivo // J Photochem Photobiol B. – 1998. – 47(2–3). – P. 121–8.
4. Andikyan V., Kronschnabl M., Hillemanns M. et al. Fluorescence diagnosis with 5-ALA thermogel of cervical intraepithelial neoplasia // Gynakol Geburtshilfliche Rundsch. – 2004. – 44(1). – P. 31–7.
5. Borelli C., Herzinger T., Merk K. et al. Effect of subcutaneous infiltration anesthesia on pain in photodynamic therapy: a controlled open pilot trial // Dermatol Surg. – 2007. – 33(3). – P. 314–8.
6. Bourre L., Thibaut S., Briffaud A. et al. Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid thermosetting gel formulation for use in photodynamic therapy of lesions of the gastrointestinal tract // Pharmacol Res. – 2002. – 45(2). – P. 159–65.
7. Casas A., Fukuda H., Batlle A.M. Tissue distribution and kinetics of endogenous porphyrins synthesized after topical application of ALA in different vehicles // Br.J.Cancer. – 1999. – 81(1). – P. 13–8.

При проведении контроля качества препаратов в процессе хранения было обнаружено, что гели на основе карбопола проявляли агрегационную нестабильность. В гелях на основе хитозана происходило относительно быстрое снижение биологической активности АЛК: значения Дф после 4-часовой аппликации в коже кролика геля, хранившегося 6 месяцев, были в ~2 раза ниже, чем при применении геля, приготовленного *ex tempore*. При применении гелей на основе ГЭЦ в течение 18 мес после их приготовления снижения интенсивности индуцированной флуоресценции в коже кролика (аппликация – 4 часа) не наблюдалось. Данные физико-химических анализов также показали высокую стабильность состава гелей на основе ГЭЦ как минимум в течение 1 года. Таким образом, для разработки лекарственной формы АЛК для наружного применения были выбраны гидрогели на основе ГЭЦ с 20 % содержанием АЛК и добавлением ДМСО.

Выводы

1. АЛК в составе гелей на основе хитозана, карбопола или ГЭЦ при их нанесении на кожу в зоне роста опухоли индуцировала синтез РРiX в коже и опухоли.
2. С увеличением времени аппликации с 1 до 4-х часов интенсивность флуоресценции РРiX в коже и опухоли возрастала.
3. С увеличением концентрации АЛК в геле с 5 % до 20 % интенсивность флуоресценции в опухоли возрастала.
4. Введение ДМСО в гелевую композицию приводит к более равномерному распределению индуцированного РРiX в опухоли.
5. АЛК в составе гелей на основе хитозана, карбопола или ГЭЦ обладает способностью проникать через роговой слой кожи и всасываться в кровь животных, о чем свидетельствует факт обнаружения индуцированного РРiX в тканях внутренних органов и участках кожи, отдаленных от зоны аппликации геля.
6. Для разработки лекарственной формы АЛК для наружного применения был выбран гидрогель на основе ГЭЦ с содержанием АЛК 20 %, включающий ДМСО и отличающийся наибольшей стабильностью физико-химических и биологических свойств в процессе хранения.

Работа выполнена при поддержке гранта правительства г. Москвы.

8. Casas A., Fukuda H., Di Venosa G., Batlle A.M. The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolaevulinic acid. Implications in cutaneous photodynamic sensitization // *Br J Dermatol.* – 2000. – 143(3). – P. 564–72.
9. Fehr M.K., Hornung R., Degen A. et al. Photodynamic therapy of vulvar and vaginal condyloma and intra-epithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulinic acid // *Lasers Surg Med.* – 2002. – 30(4). – P. 273–9.
10. Kacerovska D., Pizinger K., Kumpova M., Cetkovska P. Genital warts treated by photodynamic therapy // *Skinmed.* – 2007. – 6(6). – P. 295–7.
11. Krammer B., Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside // *Photochem Photobiol Sci.* – 2008. – 7(3). – P. 283–9.
12. McCarron P.A., Donnelly R.F., Andrews G.P., Woolfson A.D. Stability of 5-aminolevulinic acid in novel non-aqueous gel and patch-type systems intended for topical application // *J. Pharm. Sci.* – 2005. – 94(8). – P. 1756–71.
13. Pottier R.H., Kennedy J.C., Reid R.L. New Directions in ALA-PDT // *Proc.SPIE.* – 1998. – 3191. – P. 200–9.
14. Tierney E., Barker A., Ahdout J. et al. Photodynamic therapy for the treatment of cutaneous neoplasia, inflammatory disorders, and photoaging // *Dermatol Surg.* – 2009. – 35(5). – P. 725–46.
15. Turchiello R.F., Vena F.C., Maillard P. et al. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT) // *J Photochem Photobiol B.* – 2003. – 70(1). – P. 1–6.
16. Vonarx V., Eleouet S., Carre J. et al. Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid bioadhesive gel formulation for the photodynamic treatment of lesions of the gastrointestinal tract in mice // *Journal of pharmacy and pharmacology.* – 1997. – 49(7). – P. 652–6.
17. Warloe T., Peng Q., Heyerdahl H. et al. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induced porphyrins and DMSO/EDTA for basal carcinoma // *Proc.SPIE.* – 1994. – 2371. – P. 226–35.

Информационное письмо № 1

III Всероссийская научная конференция с международным участием «Наноонкология», САРАТОВ, 6–7 СЕНТЯБРЯ 2011 г.

Глубокоуважаемые коллеги!

Нанотехнологическое общество России,
Российская академия медицинских наук, РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН,
Российская академия наук,
Министерство промышленности и энергетики Саратовской области,
Саратовский научный центр РАН,
Учреждение Российской академии наук,
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН),
ГОУ ВПО Саратовский Государственный Университет имени Н.Г. Чернышевского,
ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
6–7 сентября 2011 года проводят
III Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Наноонкология»

На конференции будут представлены доклады ведущих ученых в области нанотехнологий Барышников А.Ю., Оборотовой Н.А., Швеца В.И., Хлебцова Н.Г., Терентюка Г.С., Дыкмана Л.А., Тучина В.В., а также специалистов из Научного Курчатовского Центра.

Основные научные направления конференции:

- нанобиотехнологии в диагностике онкологических заболеваний;
- нанофармация противоопухолевых препаратов;
- токсикология и фармакология наносомальных форм противоопухолевых препаратов;
- нанометрология;
- механизмы противоопухолевого действия нанопрепаратов;
- направленная доставка противоопухолевых препаратов;
- диагностики и терапия с использованием металлических наночастиц

Тезисы докладов III Всероссийской научной конференции «Наноонкология» будут опубликованы в «Российском биотерапевтическом журнале». В регламенте конференции предусмотрены следующие формы предоставления материалов: пленарный, секционный, стендовый доклады.

(продолжение см. на стр. 72)

**III Всероссийская научная конференция с международным участием
«Наноонкология», САРАТОВ, 6–7 СЕНТЯБРЯ 2011 г.**

Глубокоуважаемые коллеги!

Нанотехнологическое общество России,
Российская академия медицинских наук, РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН,
Российская академия наук,
Министерство промышленности и энергетики Саратовской области,
Саратовский научный центр РАН,
Учреждение Российской академии наук,
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН),
ГОУ ВПО Саратовский Государственный Университет имени Н.Г. Чернышевского,
ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
6–7 сентября 2011 года проводят
III Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Наноонкология»

Для участия в конференции необходимо прислать регистрационную форму в адрес Оргкомитета. Зарегистрироваться можно по Интернету на сайте www.ronc.ru, или выслать регистрационную форму и тезисы докладов по адресу Оргкомитета или по электронной почте: nanoconference2011@rambler.ru

Срок подачи заявки для участия с докладом до **01 июня 2011 г.**

Срок подачи тезисов до **01 июля 2011 г.**; регистрация участников до **20 июля 2011 г.**

По всем вопросам, связанным с участием в конференции, обращаться в Оргкомитет.

РЕГИСТРАЦИОННАЯ ФОРМА-ЗАЯВКА

III Всероссийская научная конференция с международным участием

«Наноонкология», Саратов 6–7 сентября 2011 г.

Фамилия _____	Имя _____	Отчество _____
должность _____ ученая степень _____		
название учреждения: _____		
адрес учреждения: _____		
телефон: _____ факс: _____		
адрес электронной почты: _____		
форма участия: _____		
(устное сообщение, стендовое сообщение, публикация тезисов)		
название доклада: _____		
Бронирование номера в гостинице		
Да _____ Нет _____		
с 5 сентября по 7 сентября 2011 г.		

(продолжение см. на стр. 78)

УДК 616-006-092.9:576.385.5

*Т.А. Маньчева, Н.А. Плотникова***МЕЛАТОНИН И МЕТФОРМИН ПОДАВЛЯЮТ ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ ПРИ ИНДУЦИРОВАННЫХ БЕНЗ(А)ПИРЕНОМ НЕОПЛАЗИЯХ У МЫШЕЙ***Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, медицинский институт, Саранск***Контактная информация***Маньчева Татьяна Александровна, аспирантка кафедры патологии с курсом патологической физиологии медицинского института***адрес:** 430034, Республика Мордовия, Саранск, ул. Коваленко, д. 12; **тел.** +7(927)176-07-52;**e-mail:** gerbera1412@yandex.ru

Статья поступила: 13.10.2010, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Цель работы – изучение влияния совместного применения мелатонина и метформина на процессы морфогенеза, патогенетических механизмов экспериментальных опухолей кожи, исследование ангиогенеза в ткани индуцированных неоплазий. Эксперимент проведен на самках белых мышей. Опухоли тонкой кожи индуцировали аппликациями бенз(а)пирена в течение шести месяцев. Изучено действие применяемых препаратов на канцерогенез мягких тканей *in vivo*, продемонстрировано их ингибирующее действие на развитие опухолей кожи и их метастатическую активность. Показано достоверное снижение абсолютного числа новообразований кожи при использовании в эксперименте мелатонина и метформина. Дана оценка динамики процессов ангиогенеза в опухолевой ткани. При коррекции канцерогенного эффекта бенз(а)пирена изучаемыми препаратами наблюдалась тенденция к увеличению содержания малонового диальдегида и отмечено некоторое снижение уровня каталазы в гомогенатах опухолевой ткани. Совместное применение мелатонина и метформина оказывает более выраженный онкостатический эффект на динамику изучаемых показателей в условиях индуцированного опухолевого роста.

Ключевые слова: мелатонин, метформин, бенз(а)пирен, неоангиогенез, морфогенез.*T.A. Mancheva, N.A. Plotnikova***MELATONIN AND METFORMIN RENDER THE TUMOR GROWTH BEING INDUCED BY BENZ(A)PIREN OF MICE***Mordovian N.P. Ogariov State University, institute of medicine, Saransk***Abstract**

In this study we have examined the effect of a joint application of melatonin and metformin on morphogenesis, pathogenetic mechanisms of experimental skin tumor development and angiogenesis in of white female mice induced neoplasia. The tumor of thin skin was induced by benz(a)piren application for six months. The effect of the applied preparations upon soft tissue cancerogenesis has been studied *in vivo*. We have also examined the effect of joint application on the development of skin tumor as well as their metastatic activity. A reliable decrease in the absolute number of skin tumor new formation was shown in the experiment with melatonin and metformin. The dynamic of tumor angiogenesis was also evaluated. A tendency to an increase in malondialdehyde content is actually observed when we corrected the benz(a)piren cancerogenous effect due to the application of melatonin and metformin in the experiments. A certain decrease in the catalase level in homogenates of the timorous tissue is clearly marked. Thus, the joint application of melatonin and metformin renders a more expressed oncostatic effect on the dynamics of studied features under conditions of the induced tumor growth.

Key words: melatonin, metformin, benz(a)piren, neoangiogenesis, morphogenesis.**Введение**

Онкопатология занимает одно из лидирующих мест в структуре смертности населения. Отмечается стойкая тенденция к росту заболеваемости злокачественными новообразованиями.

К числу наиболее значимых направлений современной медицины относятся исследования закономерностей канцерогенеза и фармакологической коррекции развития злокачественных новообразований [2].

Канцерогенез – многостадийный процесс, в течение которого нормальная стволовая клетка проходит последовательно несколько стадий, прежде чем станет злокачественной. Это сопровождается многообразными нарушениями внутреннего гомеостаза, изменениями нервной, иммунной и эндокринной систем [3].

Особая роль в процессе канцерогенеза принадлежит ангиогенезу. Общеизвестно, что неоангиогенез – это процесс образования новых кровеносных сосудов в органах и тканях.

Нарушение его приводит к развитию доброкачественных и злокачественных опухолей. Он играет важную роль в пролиферации солидных опухолей и метастазировании [8].

Известно, что трофика опухолей небольших размеров (1–2 мм) осуществляется путем диффузии питательных веществ из окружающих тканей. Тогда как более крупные опухоли нуждаются в дополнительном кровоснабжении, что происходит за счет гиперэкспрессии ангиогенных факторов, таких как VEGF (ангиогенный «переключатель») [7]. VEGF, фактор роста эндотелия сосудов, влияет на развитие новых (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка).

При многих видах опухолей усиление экспрессии VEGF коррелирует с неблагоприятным прогнозом, в том числе – с агрессивным ростом опухоли, рецидивами, метастазированием и уменьшением выживаемости. Кроме того, экспрессия VEGF коррелирует с повышением плотности микрососудистой сети в опухоли, что само по себе служит предиктором прогноза при различных онкологических заболеваниях [8].

Понимание механизмов ангиогенеза способствует повышению эффективности лечения опухолей различной локализации.

В течение всей жизни на человека воздействует большое число канцерогенов как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Кроме того, постоянно создаются условия для инициации канцерогенеза в тех или иных органах и тканях. В связи с этим, для профилактики опухолевого роста наиболее физиологичным является использование естественных, эндогенных онкопротекторов.

В последние годы большое внимание уделяется изучению антиканцерогенного эффекта гормона эпифиза – мелатонина и антидиабетического бигуанида – метформина.

В ходе многолетних исследований установлены наиболее важные физиологические эффекты мелатонина: подавление клеточной пролиферации и антиопухолевое действие по отношению ко многим экспериментальным неоплазиям, кроме того, мелатонин является одним из сильнейших эндогенных поглотителей свободных радикалов.

Способность антидиабетических бигуанидов устранять явления метаболической иммунодепрессии послужили основанием использовать их в онкологической клинике для нормализации некоторых нарушений обмена, свойственных онкологическим больным [1]. В литературе имеются данные об антиокислительном действии антидиабетических бигуанидов [9], их прямом действии на митохондрии [10]. Несмотря на то, что противоопухолевая активность метформина и мелатонина известна довольно давно, в течение длительного периода времени их действие изучалось в основном *in vitro* на культурах опухолевых клеток различного гистогенеза. Изучение влияния метформина и мелатонина на опухолевый рост *in vivo* проводилось на моделях перевиваемых, спонтанных опухолей, а также опухолей, индуцированных различными канцерогенами.

Изучение действия мелатонина и метформина на процессы неоангиогенеза в условиях индуцированного опухолевого роста является на современном этапе важным направлением не только в экспериментальной онкологии, но и в практической лечебной деятельности.

Цель работы – изучение влияния совместно-го применения мелатонина и метформина на канцерогенез кожи, исследование ангиогенеза и процессов перекисного окисления липидов в ткани индуцированных неоплазий кожи у мышей.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

1. Изучение влияния мелатонина и метформина на частоту, множественность и размеры опухолей кожи, индуцированных бенз(а)пиреном у мышей.
2. Исследование влияния мелатонина и метформина на процессы неоангиогенеза в ткани экспериментальных неоплазий.
3. Изучение динамики процессов перекисного окисления липидов в гомогенатах опухолевой ткани.

Анализ зависимости совместного воздействия мелатонина и метформина на динамику морфологических изменений в условиях бенз(а)пиренового опухолевого роста.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 220 самках нелинейных белых мышей. Аутбредные *SHR/u* белые мыши массой 20–22 г получены из Питомника лабораторных животных (г. Уфа) в возрасте 2 мес.

Эксперимент выполнялся в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755).

Животные содержались в стандартных условиях вивария, при режиме освещения: 12 часов свет, 12 – темнота, получали без ограничений воду и гранулированный корм.

В возрасте 3 мес 200 мышей были разделены на 4 группы по 50 особей, оставшиеся 20 мышей (5 группа) не подвергались каким-либо воздействиям и служили интактным контролем.

Животным первых четырех групп два раза в неделю наносили на предварительно выбритый участок кожи спинки Ø1,5–2 см (межлопаточная область) бенз(а)пирен (Fluka, Busch, Швейцария) в концентрации 0,05 %, растворенный в ацетоне, в дозе 0,2 мл на мышью.

Со следующего после введения канцерогена дня животные **2 группы** получали с питьевой водой в ночные часы (с 19.00 ч. до 07.00 ч.) мелатонин (Sigma, St.Louis; MS, США) в дозе 2 мг/л. Раствор мелатонина готовился ежедневно *ex tempore*. Мелатонин растворяли в нескольких каплях 96%-ного этилового спирта и доводили до нужной концентрации водой. Животные **3 группы** получали с питьевой водой в течение всего дня метформин (Сиофор 500 БЕРЛИН-ХЕМИ АГ/МЕНАРИНИ ГРУПП, Германия) в дозе 200 мг/л. Раствор метформина (Сиофор 500) готовился ежедневно *ex tempore*. Сиофор 500 растворяли в нескольких миллилитрах теплой воды и доводили до нужной концентрации водой. Животные **4 группы** получали с питьевой водой в течение всего дня метформин в дозе 200 мг/л и в ночные часы (с 19.00 ч. до 07.00 ч.) мелатонин в дозе 2 мг/л. Животные 1 группы составили контроль по канцерогену и получали питьевую воду без добавления мелатонина и метформина.

Длительность эксперимента составила 6 мес. Оставшиеся в живых мыши были выведены из эксперимента путем декапитации, сопровождавшейся адекватной анестезией с использованием диэтилового эфира. У части мышей из каждой группы животных, подвергшихся воздействию бенз(а)пирена, и у всех интактных мышей была забрана ткань опухоли кожи для гистологического, иммуногистохимического и биохимического исследований.

На протяжении опыта за животными вели постоянное наблюдение, всех мышей пальпировали 2 раза в неделю для выявления опухолей. На схемах отмечали сроки обнаружения, локализацию, размеры и степень изъязвления опухолевых узлов.

Патоморфологическое исследование

Все погибшие животные и мыши, которые были выведены по истечении срока эксперимента, вскрывались и подвергались тщательному патоморфологическому исследованию.

На аутопсии исследовались кожные покровы и внутренние органы. Производился подсчет общего числа опухолевых узлов кожи, определялись их размеры и локализация.

Все опухолевые узлы, а также ткани и органы, подозрительные на наличие новообразований, были иссечены и зафиксированы в 10 %-ном нейтральном формалине. После обычной гистологической обработки кусочки ткани были залиты в парафин. Тонкие, 5–7 мкм гистологические срезы были окрашены гематоксилин-эозином и исследованы светооптически. Неоплазии классифицировались согласно рекомендациям МАИР. В ходе ИГХ-исследования гистологических срезов, которое проводилось с использованием проявочных тест-систем, была изучена экспрессия ангиогенных факторов в ткани индуцированных опухолей. Экспрессия VEGF и количество кровеносных сосудов, окрашенных антителами к CD31, изучались с использованием коммерческих антител и проявочных тест-систем в соответствии с инструкциями производителей.

Подсчитывали количество CD31⁺ микрососудов в опухоли не менее чем в 3 полях зрения при увеличении $\times 20$. Экспрессию VEGF определяли по интенсивности окрашивания опухолевых клеток, как 1⁺ – при низкой интенсивности окрашивания, и как 2⁺ – при средней интенсивности окрашивания.

В гомогенатах опухолевой ткани оценивали интенсивность процессов перекисного окисления липидов. Для этого определяли уровень МДА [5] и активность каталазы [6]. МДА представляет собой вторичный (промежуточный) продукт реакций перекисного окисления липидов. Каталаза – один из основных ферментов антиоксидантной системы организма, катализирует восстановление перекиси водорода до воды, уменьшая, тем самым, образование свободных радикалов [4].

Гомогенаты готовили следующим образом: кусочки тканей отрезали ножницами, отмывали от крови охлажденным 0,9 %-ным раствором натрия хлорида, обсушивали фильтровальной бумагой. Навески тканей помещали в фарфоровую ступку. С помощью шлифовального пестика производили тщательное гомогенизирование в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия в соотношении 1:9.

Уровень МДА в гомогенатах опухолевой ткани определяли по методу С.Г. Конюховой [5]. Активность каталазы в изучаемой среде выявляли по методике М.А. Королук [6]. Макропрепараты фотографировали цифровой фотокамерой Nikon Coolpix 4500 в макро-режиме.

Микропрепараты тканей опухолей фотографировали цифровой камерой Nikon Coolpix 4500 с помощью микроскопа Микмед-2 при увеличении $\times 100$ и $\times 400$. Полученные микрофотографии обрабатывали с помощью пакета программ Adobe Photoshop 7.0. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критериев t Стьюдента, точного метода Фишера χ^2 с помощью пакета прикладных программ «МедСтатистика» и «Биостат». Во всех случаях различия считались достоверными при уровне вероятности большим 95 %, т.е. $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У мышей четырех экспериментальных групп, начиная с третьего месяца опыта, на месте аппликаций канцерогена, наблюдалось появление опухолевидных бугристых образований.

Результаты исследований влияния мелатонина и метформина на развитие опухолей кожи, индуцированных аппликациями бенз(а)пирена, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние мелатонина и метформина на развитие опухолей кожи, индуцируемых аппликациями бенз(а)пирена

Показатель	БП + вода	БП + мелатонин	БП + метформин	БП + мелатонин + метформин
Число животных	50	50	50	50
Эффективное число животных*	46	47	49	45
Общее число животных с опухолями	31 (67,4%)	25 (53,2%)	30 (61,2%)	20 (44,4%)***
Число животных со злокачественными опухолями	23 (50,0%)	16 (34,0%)	18 (36,7%)	11 (24,4%)
Число животных с папилломами	16 (34,8%)	13 (27,7%)	14 (28,6%)	12 (26,7%)
Среднее число опухолей на 1 мышью-опухоленосителя, $M \pm m$	3,4 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,3**	2,3 $\pm$ 0,4
Средний диаметр опухолей, см, $M \pm m$	3,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2****	2,1 $\pm$ 0,2****	2,0 $\pm$ 0,3***

*Число животных, доживших до времени обнаружения 1-й опухоли в опыте.

Различие с соответствующим показателем для группы БП + вода достоверно:

** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$.

Общая частота опухолей кожи в этих группах составила:

- 67,4 % (31 животное из 46) в контрольной группе;
- 53,2 % (25 животных из 47, получавших мелатонин);
- 61,2 % (30 животных из 49, получавших метформин);
- 44,4 % (20 животных из 45, получавших мелатонин и метформин совместно), различия достоверны ($p < 0,01$).

По данным гистологического исследования относительная частота плоскоклеточных ороговевающих карцином кожи составила 50,0 % (23 мыши); 34,0 % (16 мышей); 36,7 % (18 мышей) и 24,4 % (11 мышей) соответственно.

Число животных с гистологически верифицированными папилломами кожи составило в контроле 16 (34,8 %), при коррекции мелатонином – 13 мышей (27,7 %).

В группе животных, получавших метформин, количество мышей с папилломами кожи составило 14 (28,6 %). При совместном применении метформина и мелатонина данное число составляет 12 (26,7 %).

Показатели существенно не отличаются от таковых группы контроля ($p > 0,05$).

Применение мелатонина и метформина уменьшает число животных с гистологически верифицированными карциномами и папилломами кожи. Но полученные данные статистически недостоверны ($p > 0,05$).

Применение метформина достоверно уменьшало множественность развития опухолей кожи, тогда как применение мелатонина, метформина или их комбинации достоверно уменьшало средние размеры опухолевых узлов.

Среднее число опухолей на 1 мышь-опухоленосителя в группе контроля составляет $3,4 \pm 0,4$, а при применении мелатонина данный показатель уменьшился на 29 % по сравнению с контролем и составил $2,4 \pm 0,4$. В группе животных, получавших метформин, показатель равен $2,1 \pm 0,3$, что меньше, чем в контроле на 38 %, полученные данные статистически достоверны ($p < 0,05$). При совместном применении метформина и мелатонина среднее число опухолей на 1 мышь-опухоленосителя на 32 % меньше (по сравнению с контролем) и составляет $2,3 \pm 0,4$.

Средний диаметр опухолей составляет $3,4 \pm 0,2$ см в группе контроля, в группе, получавших мелатонин – $1,6 \pm 0,2$ см, что меньше на 53 %, чем в группе контроля, ($p < 0,001$); при применении метформина данный показатель составил $2,1 \pm 0,2$ см, то есть уменьшился на 38 % по сравнению с контролем ($p < 0,01$); при применении метформина и мелатонина одновременно средний диаметр опухолей на 41 % меньше, чем у животных контрольной группы и составил – $2,0 \pm 0,3$ см ($p < 0,01$).

Число животных с метастазами в легкие в группе контроля составило 2 (6,5 %), в группе мышей, получавших мелатонин – 1 (4 %). При коррекции метформином и совместно с мелатонином метастазы в легкие выявлены не были.

Через 84 суток от начала аппликаций бенз(а)пиреном у мышей контрольной группы сформировались узелки в месте воздействия канцерогена. По своей структуре опухолевидные образования плотнотканной консистенции, выступающие над поверхностью неизмененных кожных покровов округлой или округло-овальной формы, размером не более 2 мм (рис. 1. см. вклейку).

В экспериментальных группах введение мелатонина и метформина не привело к статистически значимому изменению времени появления первого опухолевого узла и составило в среднем 86 суток.

В динамике узлы теряли подвижность, становились несмещаемыми и увеличивались в размерах, изъязвлялись с формированием язв с подрытыми плотными краями и западающим дном с обильными темными наложениями и явлениями гиперкератоза (рис. 2–3).

Макроскопически опухолевые узлы у животных экспериментальных групп не отличались от таковых у мышей в контроле.

На заключительных этапах эксперимента опухолевые узлы достигали максимальных размеров (до 5 см в $\varnothing$) и язвенные дефекты занимали большую часть поверхности спинки мыши. Наблюдались вторичные изменения в тканях опухолей с явлениями нагноения и распада (рис. 4).

У ряда мышей контрольной группы опухолевидные образования располагались не только в месте непосредственного воздействия канцерогена, но и на отдаленных участках.

При микроскопическом исследовании опухолевидных образований тонкой кожи мышей всех групп наблюдалась гистологическая картина, характерная для плоскоклеточного ороговевающего рака и папиллом.

На ранних этапах канцерогенеза отмечается диффузное разрастание покровного эпителия и его дериватов. Впоследствии появляются атипические

разрастания, имеющие склонность к ороговению в центре. Из подобных очаговых пролифератов возникают сформировавшиеся опухоли.

Сформированные папилломы микроскопически представляют собой очаги дифференцированного эпителия, четко отграниченные от окружающих тканей с выраженными явлениями гиперкератоза. Клетки, составляющие такие очаги, значительно крупнее по сравнению с окружающими эпителиоцитами кожи, имеют светлую цитоплазму и крупное ядро с несколькими ядрышками. При малигнизации папилломы приобретают характерные черты: атипичные эпителиальные клетки погружаются в рыхлую соединительнотканную основу, глубоко идущие тяжи эпителия проникают через ножку папилломы, достигают глубоких слоев дермы. Подобное строение отражает начало инфильтративного роста и формирование типичного плоскоклеточного рака. Эпителиоциты имеют различную степень дифференцировки. Иногда клетки анаплазированы и прорастают в подлежащие мышцы. Однако в большинстве случаев имеются признаки усиленного ороговения. Как правило, выявляются различные формы дискератоза и всегда выраженный гиперкератоз. На поверхности папиллом выявляются плотные роговые массы. В поверхностных слоях эпителия обнаруживаются некробиотические изменения, участки изъязвления папиллом (рис. 5).

Микроскопически плоскоклеточный рак кожи представлен атипичными опухолевыми клетками разной степени дифференцировки. В подавляющем большинстве случаев это плоскоклеточный ороговевающий рак и низкодифференцированный плоскоклеточный неороговевающий рак кожи (рис. 6). Процессы ороговения характеризуются формированием типичных для этого вида рака «жемчужин» из рогового вещества. В центральной части опухолевых пролифератов выявляются очаги некроза, явления стаза и полнокровия сосудов в строме неоплазий (рис. 7). Метастазы плоскоклеточного рака кожи в легкие микроскопически представлены очаговыми скоплениями мелких, гиперхромных, полиморфных опухолевых клеток, расположенных главным образом периваскулярно.

Несмотря на инвазивный рост метастазов, опухолевые пролифераты достаточно четко отграничены от окружающей ткани легкого. В подобных узлах отмечается явное преобладание паренхимы над стромой опухоли. Легочная ткань в окружности узлов находится в коллабированном состоянии. Метастазирование происходит как лимфогенно, так и гематогенно, распространяясь по типу ракового эмбола (рис. 8). Интенсивность ангиогенеза в опухоли оценивалась по экспрессии основного стимулятора ангиогенеза VEGF и по среднему количеству сосудов в опухоли.

В группе контроля количество CD31⁺ сосудов в поле зрения составило 15 ± 3 , под влиянием мелатонина количество CD31⁺ сосудов уменьшилось до 10 ± 5 , а при использовании метформина и комбинации мелатонина и метформина результаты составили 8 ± 3 , что еще меньше по сравнению с контролем и группой, получавшей мелатонин.

В группе контроля интенсивность окрашивания опухолевых клеток на VEGF составила 2⁺ – как средняя интенсивность окрашивания, под воздействием мелатонина – 1^{+/2} – как показатель средней и низкой интенсивности окрашивания, а при использовании метформина и комбинации мелатонина и метформина результат составил 1⁺ – низкая интенсивность окрашивания (табл. 2).

Пролиферативная активность опухолевой ткани определялась по индексу Ki-67. Ki-67 – антиген, присутствующий только в пролиферирующих клетках в G₁, G₂ и M-фазах клеточного цикла.

В нормальной ткани кожи обнаруживается низкий уровень экспрессии Ki-67. Экспрессия Ki-67 локализуется преимущественно в базальных слоях эпителия, где средний индекс Ki-67⁺ клеток не превышает 7±4 %. В процессе малигнизации эпителиальных клеток кожи увеличивается количество Ki-67⁺ клеток, что свидетельствует об усилении пролиферативной активности.

В группе контроля средний индекс Ki-67⁺ клеток составил 70±12 %, что во много превышает показатель в нормальной ткани; при применении мелатонина средний индекс Ki-67 снизился и составил 50±10 %. В группе животных, получавшие метформин, отмечалось еще большее уменьшение пролиферативной активности – 10±7 %, а при совместном применении мелатонина и метформина данный показатель составил 8±5 %, что свидетельствует о еще более низкой пролиферативной активности по сравнению с другими группами (табл. 3).

Одним из механизмов реализации канцерогенного эффекта бенз(а)пирена является изменение показателей перекисного окисления липидов. Динамику активности ПОЛ в эксперименте оценивали по содержанию одного из конечных продуктов свободно-радикальной реакции липоперекисления – МДА, уровень которого определяет тяжесть патологических изменений, а также – по активности каталазы как показателя протекторных свойств клетки. По сравнению с интактными в группе контрольных животных отмечается достоверное увеличение содержания МДА с 4,17±0,19 ммоль/л до 9,62±0,94 ммоль/л в гомогенатах ткани опухолей тонкой кожи (p<0,01). При коррекции канцерогенного эффекта бенз(а)пирена препаратами антиоксидантного ряда наблюдалась тенденция к увеличению показателей МДА в гомогенатах опухолевой ткани по сравнению с интактными животными, но данные статистически недостоверны. При сравнении с группой контрольных животных уровень МДА в ткани опухолей достоверно уменьшился на 78 % в группе животных, получавших метформин (p<0,01) и на 87 % при коррекции мелатонином совместно с метформином (p<0,001) (табл. 4).

Таблица 2

Влияние мелатонина и метформина на процессы неоангиогенеза в опухолевой ткани

Препарат	Количество CD31 ⁺ сосудов в поле зрения	Интенсивность окрашивания VEGF
Контроль	15±3	2 ⁺
Мелатонин	10±5	1 ^{+/2} ⁺
Метформин	8±3	1 ⁺
Мелатонин+Метформин	8±3	1 ⁺

Таблица 3

Влияние мелатонина и метформина на пролиферативную активность опухолевой ткани

Препарат	Средний индекс Ki-67, m+M
Контроль	70±12
Мелатонин	50±10
Метформин	10±7
Мелатонин+Метформин	8±5

Таблица 4

Содержание МДА и активность каталазы в ткани опухоли у экспериментальных животных в контроле и при коррекции мелатонином и метформином

№ группы	Воздействие	Уровень МДА в опухоли, ммоль/л	Активность каталазы в опухоли, мккат/л
		Ткань опухоли	Ткань опухоли
1	Интактный контроль	4,17±0,19	2,73±0,03
2	БП	9,62±0,94	2,52±0,11
3	БП + мелатонин	6,56±1,14	2,06±0,08
4	БП + метформин	5,40±0,78	2,17±0,15
5	БП + мелатонин + метформин	5,14±0,90	2,14±0,11
Достоверность различия между группами, p		P ₁₋₂ <0,01 P ₂₋₄ <0,01 P ₂₋₅ <0,01 P ₃₋₄ <0,01 P ₄₋₅ <0,01	P ₁₋₃ <0,001 P ₁₋₄ <0,05 P ₁₋₅ <0,01 P ₂₋₃ <0,01 P ₂₋₅ <0,05 P ₃₋₄ <0,01

Коррекция активности перекисного окисления липидов препаратами антиоксидантного ряда не привела к значимому изменению уровня содержания каталазы в ткани опухолей (по сравнению с интактными животными), но при этом отмечено некоторое снижение показателей. Подобный эффект, возможно, обусловлен тем, что введение канцерогена оказывает угнетающее действие на собственную прооксидантную систему защиты организма. В настоящей работе впервые исследовано действие мелатонина и метформина на канцерогенез ко-

жи *in vivo*, продемонстрировано их ингибирующее действие на развитие опухолей кожи и их метастатическую активность. При коррекции канцерогенного эффекта бенз(а)пирена метформином отмечается достоверное снижение общего числа животных с опухолями по сравнению с контролем.

Показано достоверное снижение абсолютно числа новообразований (карцином и папиллом) кожи при использовании в эксперименте мелатонина и метформина – препаратов, обладающих антиоксидантной активностью.

При морфологическом исследовании ткани кожи выявлено, что на фоне введения бенз(а)пирена в дозе 0,2 мл на мышь у животных контрольной группы возникали множественные папилломы и карциномы кожи. Достоверно значимые изменения выявлены при введении метформина в дозе 200 мг/л. На фоне введения препарата достоверно снижалось среднее количество опухолевых узлов на 1 мышь-опухоленосителя на 38 % по сравнению с контролем. При применении мелатонина и метформина достоверно уменьшался средний диаметр опухолей по сравнению с контролем. В работе дана оценка динамики процессов ангиогенеза и перекисного окисления липидов в опухолевой ткани при использовании мелатонина и метформина в условиях экспериментального канцерогенеза. Полученные данные отражают антиканцерогенный эффект мелатонина и метформина в условиях экспериментального канцерогенеза. Результаты выполненной работы подтверждают целесообразность дальнейших клинических исследований в этой области с целью возможного использования препаратов с антиоксидантной активностью в профилактике и комплексном лечении неоплазий.

Литература

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и генетические механизмы старения. – СПб.: Наука, 2003. – С. 302.
2. Анисимов В.Н., Забежинский М.А., Попович И.Г. Мелатонин угнетает канцерогенез толстой кишки, индуцируемый 1,2-диметилгидразином у крыс: эффекты и возможные механизмы // Вопросы онкологии – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 136–48.
3. Дильман В.М. Четыре модели медицины – М.: Медицина, 1987. – 288 с.
4. Контрицкова К.Н. Перекисное окисление липидов в норме и патологии: Учебное пособие. – Н.Новгород, 2000. – 24 с.
5. Конюхова С.Г., Дубрикайтис А.Ю., Шабунович Л.В. Роль активации перекисного окисления в патогенезе экспериментального перитонита // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1989. – № 5. – С. 557–9.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Определение активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–9.
7. Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch // Nat Rev Cancer – 2003. – 3. – P. 401–10.
8. Ferrara N. Timeline: VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors // Nat Rev. Cancer – 2002. – 2. – P. 795–803.
9. Mattson M.P., Duan W., Lee J. et al. Progress in the development of caloric restriction mimetic dietary supplements // J. Anti-Aging Med. – 2001. – 4. – P. 225–32.
10. Owen M.R., Hastrap A.P. The mechanisms by which mild respiratory chain inhibitors inhibit hepatic neoglucogenesis // Biochim. Biophys. Acta. – 1993. – 1142. – P. 11–22.

Информационное письмо № 1

III Всероссийская научная конференция с международным участием «Наноонкология», САРАТОВ, 6–7 СЕНТЯБРЯ 2011 г.

Глубокоуважаемые коллеги!

Нанотехнологическое общество России,
Российская академия медицинских наук, РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН,
Российская академия наук,
Министерство промышленности и энергетики Саратовской области,
Саратовский научный центр РАН,
Учреждение Российской академии наук,
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН),
ГОУ ВПО Саратовский Государственный Университет имени Н.Г. Чернышевского,
ГОУ ВПО Саратовский государственный университет им. В. И. Разумовского
6–7 сентября 2011 года проводят
III Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Наноонкология»

Орг. взносы: 300 руб. для студентов и аспирантов, 1000 руб. для участников конференции.

По вопросам размещения в гостиницах г. Саратова обращаться к представителю локального Оргкомитета г. Саратова Остудину Николаю Алексеевичу, ostudin@ibppm.sgu.ru, тел.: 8-452-97-03-97

(окончание см. на стр. 88)

УДК 616.33-006.6-07:577.2.088

*А.Ж. Муктубаева, Н.А. Шаназаров, А.Х. Сабиров, М.В. Антонов***МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТИНА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА***ГОУ ВПО Тюменская государственная медицинская академия Росздрава***Контактная информация***Сабиров Ахат Халимович, д-р мед. наук, доцент кафедры онкологии с курсом ЛД и ЛТ***адрес:** 625039, Тюмень, ул. Одесская, д. 54; **тел.** +7(3452)41-09-36, **моб.** +7(912)921-22-22;**e-mail:** sabirov58@mail.ru

Статья поступила: 23.12.2010, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

В работе представлены результаты исследования молекулярно-генетического статуса, уровней экспрессии свободно-растворимой формы рецептора эпидермального фактора роста EGFR и сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF, определяемых у больных раком желудка, которые рассматриваются в качестве перспективных маркеров, характеризующих биологическое поведение опухоли и позволяющих индивидуализировать подходы к назначению терапии больных раком желудка.

Показана корреляция мутаций в некоторых онкогенах с гистологическим вариантом опухоли, их диагностическая и прогностическая значимость.

Ключевые слова: мутация онкогенов, рецепторы факторов роста, пролиферативная активность, онкомаркеры.

*A.Zh. Muktubaeva, N.A. Shanazarov, A.H. Sabirov, M.V. Antonov***The molecular-genetic status in patients with gastric cancer***Tumen State Medical Academy***Abstract**

In this paper we present the alterations in molecular-genetic status, and expression levels of freely soluble forms of epidermal growth factors' receptor EGFR and vascular endothelial growth factor VEGF, to estimate their prognostic significance in patients with gastric cancer. EGFR and VEGF considered as markers characterizing tumor's behavior and help us to individualize approaches to therapy.

Here we show the correlation between the mutations in certain oncogenes with histological variant of tumor in gastric cancer patients.

We also estimate the diagnostic and prognostic significance of these markers.

Key words: oncogene mutations, growth factors' receptors, proliferative activity, tumor markers.

Введение

В структуре смертности онкологические заболевания занимают 2 место, уступая лишь заболеваниям сердечно-сосудистой системы. При этом 30 % умерших от онкологических новообразований составляют лица трудоспособного возраста [4].

Одной из наиболее актуальных проблем современной онкологии является рак желудка, это обусловлено высокой частотой выявления заболевания и высоким удельным весом распространенности и запущенности.

Длительное время рак желудка являлся одной из ведущих причин смертности во всем мире, за последние десятилетия частота этого заболевания постепенно снижается.

В Тюменской области показатель заболеваемости раком желудка за 10 лет снизился [2; 3] с 20,3 до 17,53 на 100 000 населения (1998–2008 гг.).

До сих пор не решены проблемы ранней диагностики и рационального комбинированного лечения опухолевого процесса.

Поэтому изучение диагностической значимости частоты выявления изменений некоторых онкогенов и определение уровней экспрессии свободно-растворимой формы рецептора EGFR и VEGF при раке желудка у человека является весьма актуальной.

Изучение молекулярно-генетического статуса, а именно изменения в онкогенах p53 (5–8 ex), C-kit, B-raf, APC, K-ras, E-caderin, DPDY, p16 и определение

уровней экспрессии свободно-растворимой формы EGFR и VEGF рассматривается в качестве перспективных маркеров, характеризующих биологическое поведение опухоли и позволяющих индивидуализировать подходы к назначению терапии больным раком желудка [1].

Но несмотря на значительное количество исследований, однозначного ответа на вопрос о значении изменений в онкогенах p53 (5; 6; 7; 8 ex), C-kit, B-raf, APC, K-ras, E-caderin, DPDY, p16 при развитии опухолевого процесса у человека до настоящего времени пока не получено.

Цель работы – изучить молекулярно-генетические изменения у больных раком желудка.

Задачи исследования

1. Определить характер мутаций в ДНК больных раком желудка, выделенной из парафиновых образцов; оценить их прогностическое значение.
2. Определить характер мутаций в ДНК при раке желудка, выделенной из плазмы и клеток крови; оценить их прогностическое значение.
3. Определить уровень экспрессии свободно-растворимой формы EGFR и VEGF; в динамике оценить их прогностическое значение.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе ООО «Центр молекулярно-генетической диагностики Сабирова А.Х.». Объектом служили 47 больных раком желудка, проходившие обследование и лечение в Тюменском областном онкологическом диспансере и центре молекулярно-генетической диагностики с июля 2008 по сентябрь 2010 гг., из которых в исследование были включены пациенты после оперативного лечения и с наиболее полной молекулярно-генетической картиной (n=11). Определение уровня экспрессии свободнорастворимой формы EGFR и эндотелиального фактора роста VEGF в сыворотке крови проводили с помощью ИФА в модификации ELISA. Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили клетки опухоли, плазма и клетки крови больных. Выделение ДНК проводили с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Наличие мутаций определяли в онкогенах p53 (5-8 ex), C-kit, B-raf, APC, K-ras, E-caderin, PDY и p16 с использованием специально подобранных праймеров. Результаты верифицировали прямым секвенированием полученных фрагментов.

Результаты

Среди 47 больных раком желудка 11 были после оперативного лечения и с наиболее полной молекулярно-генетической картиной (n=11). 7 больным (63,6 %) была выполнена радикальная операция (дистальная субтотальная резекция желудка, проксимальная субтотальная резекция желудка, гастрэктомия), 3 пациента (27,3 %) были прооперированы паллиативно (гастрэктомия, дистальная субтотальная резекция желудка, гастростомия) и 1 больному (9,1 %) операция была выполнена с диагностической целью. При молекулярно-генетическом исследовании в ДНК парафиновых образцов, как и в ДНК плазмы крови, наибольшее количество мутаций определяется при низкодифференцированном варианте опухоли (n=7) в генах p53 (5; 6; 7; 8 ex), C-kit, E-caderin, K-ras, APC, p16 и сопровождается высоким индексом пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67=71,25 %; при умеренно-дифференцированном варианте опухоли (n=2) мутации были выявлены в генах p53 7ex, B-raf, C-kit; несколько меньшее число мутаций выявлено при высокодифференцированном варианте опухоли (n=2) – изменения в генах p53 6ex, p53 7ex, APC (см. таблицу). В ДНК, выделенной из клеток крови, подобные изменения не выявлены.

Максимальное количество мутаций приходится на ген p53 в 7ex, что может рассматриваться в качестве маркера агрессивности опухолевых клеток, плохо отвечающих на химиотерапию.

У радикально прооперированных больных молекулярно-генетические изменения в ДНК, выделенной из плазмы крови, наблюдались в следующих онкогенах – p53 5ex(n=1), p53 6ex(n=1), p53 7ex(n=4), p53 8ex(n=1), C-kit(n=3), E-caderin(n=2), APC(n=1), B-raf(n=1), то есть не была констатирована молекулярная ремиссия, что следует учитывать для выбора дальнейшей тактики химиотерапии.

В 81,7 % случаев (9 человек) химиотерапия была назначена сразу же после оперативного лечения или после проведенного молекулярно-генетического обследования. В 18,2 % случаев (2 человека) химиотерапия не была назначена, а по результатам молекулярно-генетического исследования наблюдались мутации некоторых онкогенов и гиперэкспрессия свободнорастворимой формы рецептора эпидермального фактора роста и сосудистого эндотелиального фактора роста.

При проведении молекулярно-генетического исследования и иммуноферментного анализа в модификации ELISA после двух курсов химиотерапии достоверного снижения количества мутаций не было отмечено, что говорит о том, что молекулярная ремиссия не была достигнута и должна учитываться для выбора дальнейшей тактики проведения ХТ.

При определении уровня экспрессии свободнорастворимой формы EGFR в сыворотке крови у 11 больных раком желудка среднее значение его уровня составило 4,38 ммоль/л, что превышает пороговое значение нормы 3,6 ммоль/л.

Уровень экспрессии VEGF составил 0,5 ммоль/л, что в два раза превышает нормальные значения, 0,25 ммоль/л, и является показанием для назначения таргетной терапии.

Отдаленные результаты среди 11 прооперированных больных в 2006–2010 гг.:

- через 6 мес. после оперативного лечения удовлетворительное состояние отмечается у 100% (11) больных;
- через 1 год после проведенного оперативного лечения смертность составила – 27,3 % (3) больных;
- через 2 года – 18,2 % (2) человека;
- в настоящее время удовлетворительное состояние – у 54,5 % (6) больных.

Т а б л и ц а

Молекулярно-генетический статус больных раком желудка (n=11)

Аденокарцинома	n	ДНК по парафиновым образцам тканей	ДНК по плазме
Низкодифференцированная	7	p53 5ex(n=2) p53 6ex(n=1) p53 7ex(n=4) p53 8ex(n=1) C-kit(n=4) E-caderin(n=1) APC(n=1) p16(n=1)	p53 5ex(n=2) p53 6ex(n=1) p53 7ex(n=4) p53 8ex(n=1) C-kit(n=4) E-caderin(n=2) K-ras(n=1) APC(n=1)
Умеренно-дифференцированная	2	p53 7ex(n=1) C-kit(n=1) B-raf(n=1)	p53 7ex(n=1) C-kit(n=1) B-raf(n=1)
Высокодифференцированная	2	p53 6ex(n=2) p53 7ex(n=1) APC(n=1)	p53 7ex(n=1) APC(n=1)

Выводы

1. Наиболее частыми мутациями у больных раком желудка в ДНК, выделенной из парафиновых образцов, являются *p53* 5ex, *p53* 6ex, *p53* 7ex, *C-kit*, *APC*, что коррелирует с низкой дифференцировкой опухолевых клеток и сопровождается высоким индексом пролиферативной активности $Ki-67=71,25\%$.
2. При исследовании ДНК плазмы крови наиболее частые мутации встречаются в

- p53* 5ex, *p53* 7ex, *C-kit*, *E-caderin*, что также коррелирует с низкой дифференцировкой опухолевых клеток и высоким индексом пролиферативной активности. Подобные изменения в ДНК клеток крови не определяются.
3. Средний уровень экспрессии свободно-растворимой формы *EGFR* в сыворотке крови пациентов составил 4,38 ммоль/л, *VEGF* – 0,5 ммоль/л, что встречается при различных вариантах дифференцировки опухоли желудка.

Литература

1. Сабиров А.Х., Шаназаров Н.А., Федоров Н.М. Первый опыт применения молекулярно-генетических маркеров в оценке лечения рака желудка // Медицинская наука и образование Урала. – 2009. – №4. – С. 43–5.
2. О состоянии онкологической помощи в Тюменской области за 2003 г. – Тюмень: ООО «Издательский центр Академия», 2004. – С. 14–5.
3. О состоянии онкологической помощи в Тюменской области за 2008 г. – Тюмень: ООО «Издательский центр Академия», 2009. – С. 12–3.
4. Состояние онкологической помощи населению России в 2008 году. Под ред. Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой В.Г. – М.: ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Росздрава, 2009. – С. 64–7.

УДК 616.33-006.6:615.281.9.036

*М.А. Сеньчукова^{1,2}, О.В. Мельников², Д.Ю. Воронов², Д.В. Глухов², С.О. Митряков²***СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОВЕДЕНИЯ ДО ОПЕРАЦИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ**¹Оренбургская государственная медицинская академия, Оренбург²Оренбургский областной клинический онкологический диспансер, Оренбург**Контактная информация**

Сеньчукова Марина Алексеевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры онкологии

адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6; тел.: 8(906)831-24-13

e-mail: masenchukova@yandex.ru

Статья поступила 27.10.2010., принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Изучены отдаленные результаты лечения 59 радикально оперированных больных раком желудка в зависимости от наличия в анамнезе антибактериальной терапии. Было установлено, что назначение в прегоспитальном периоде антибактериальной терапии достоверно улучшает отдаленные результаты лечения больных раком желудка с метастазами в регионарных лимфатических узлах. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения роли антибактериальной терапии в лечении больных с инвазивным раком желудка.

Ключевые слова: рак желудка, антибактериальная терапия, отдаленные результаты лечения*М.А. Senchukova^{1,2}, O.V Melnikov², D.Y. Voronov², D.V. Gluhov², S.O. Mitraykov²***COMPARISON OF THE LONG-TERM TREATMENT RESULTS OF PATIENTS WITH GASTRIC CANCER DEPENDING ON CARRYING OUT BEFORE OPERATION OF ANTIBACTERIAL THERAPY**¹Orenburg state medical academy¹²Orenburg regional clinical oncological dispensary²**Abstract**

We have studied the long-term treatment results of 59 radical operated patients with gastric cancer depending on the presence in the anamnesis the antibacterial therapy. It was established, that management of the antibacterial therapy at a pre-hospital period considerably improved the long-term treatment results of the GC patients with the metastasis in regional lymph nodes. Elucidation of a role of antibacterial agents in treatment invasive GC is the focus of our ongoing work.

Key words: gastric cancer, antibacterial therapy, long-term treatment results**Введение**

В настоящее время клинические и экспериментальные исследования показали, что применение антибактериальных препаратов в комплексной терапии ЗНО может способствовать улучшению

отдаленных результатов лечения. В эксперименте проведение ХТ в комбинации с кларитромицином по поводу перевивной опухоли молочной железы (или назначение кларитромицина после ее хирургического удаления) достоверно увеличивало продолжительность жизни подопытных животных [13].

Положительный эффект достигнут при лечении перевивной меланомы B16BL6 у мышей [16] при экспериментальном раке желудка [4] и химически индуцированном раке легкого [12].

Применение кларитромицина практически в 2 раза увеличивало медиану выживаемости больных с нерезектабельной формой НМРЛ, получавших «классические» цитостатики и/или радиотерапию по сравнению с больными, получавшими только противоопухолевую [10] терапию (535 дней и 277 дней соответственно). Улучшение отдаленных результатов лечения при использовании антибактериальных препаратов отмечено при лечении больных злокачественными лимфомами [14], миеломной болезнью [11], ранним раком желудка [5], а при MALT-лимфомах желудка проведение антихеликобактерной терапии позволяет в 40–80 % случаев добиться полной ремиссии [7; 8]. Учитывая, что значительному числу больных со злокачественными новообразованиями желудка предварительно устанавливается диагноз язвенной болезни желудка или хронического гастрита и проводится антибактериальная терапия, проанализировано ее возможное влияние на отдаленные результаты лечения больных раком желудка.

Цель настоящего исследования – анализ влияния антибактериальной терапии, проводимой на этапе диагностики в общей лечебной сети, на отдаленные результаты лечения больных РЖ.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ историй болезни и амбулаторных карт больных раком желудка ($n=59$) со II – III стадией заболевания, оперированных в Оренбургском областном клиническом онкологическом диспансере за период с июня 2005 г. по август 2006 г. Медиана периода наблюдения (время от момента операции до 28 февраля 2010 г. или до смерти больного) составила 45 мес. Средний возраст больных $60,4 \pm 1,7$ года. Мужчин было 42 (71,2 %), женщин – 17 (28,8 %). Для анализа возможного влияния антибактериальной терапии на отдаленные результаты лечения больные были разделены на 2 группы. В 1 группу вошли 30 пациентов (50,8 %), которым на этапе диагностики в общей лечебной сети проводилась эрадикационная терапия по поводу предварительного диагноза язвенной болезни желудка или хронического гастрита. Учитывались только те больные, которым лечение проводилось в сроки от 1 до 2 мес. перед операцией продолжительностью не менее 7 дней с назначением 2 и более антибактериальных препаратов. Наиболее часто назначались комбинации следующих препаратов: амоксициллин + кларитромицин, амоксициллин + метронидазол, амоксициллин + кларитромицин + метронидазол. Средний возраст больных 1 группы составил $59,9 \pm 1,79$ года. Мужчин было 23 (76,7 %), женщин – 7 (23,3 %). 19 больным 1 группы (63,3 %) выполнена субтотальная дистальная резекция желудка, 2 больным (6,7 %) – субтотальная проксимальная резекция желудка и 9 больным (30 %) – гастрэктомия, которая в 2 случаях была комбинированной. Лимфодиссекция в объеме D_1 выполнялась всем больным, D_2 – 11 (36,7 %). Послеоперационные осложнения зафиксированы у 8 больных 1 группы (26,7 %): пневмония – у 2, анастомозит – у 2, гидроторакс – у 2, эвентерация – у 1, острый бронхит – у 1 больного.

Во 2 группу вошли 29 пациентов (49,2 %), не получавших до операции антибактериальной тера-

пии. Средний возраст больных этой группы составил $61,5 \pm 2,01$ год. Мужчин было 19 (65,5 %), женщин – 10 (34,5 %). Субтотальная дистальная резекция желудка выполнена 14 (48,3 %), субтотальная проксимальная резекция – 5 (17,2 %) и гастрэктомия – 10 (34,5 %) больным. Лимфодиссекция в объеме D_2 – 8 больным (27,6 %). Комбинированные операции провели 3 больным. Послеоперационные осложнения в раннем послеоперационном периоде зафиксированы у 5 больных 2 группы (17,2%): анастомозит – у 2, острый тромбофлебит нижней конечности – у 1, эвентерация – у 1 и кровотечение из гастроэнтероанастомоза – у 1 больного. В исследование не включались больные, получавшие после операции адъювантную химиотерапию или лучевую терапию.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием критерия Стьюдента и критерия z (для сравнения долей), с учетом числа степеней свободы. Для сравнения кривых выживаемости использован критерий Гехана. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные о распределении больных в обеих группах, в зависимости от локализации опухоли, стадии заболевания, гистологической структуры и типа роста опухоли. Как следует из данных таблицы, достоверных отличий по клиническим показателям между сравниваемыми группами не наблюдалось.

Несколько больше во 2 группе было больных с размерами опухоли больше 5 см (20 % и 37,9 % соответственно), однако указанные данные статистически недостоверны.

При сравнении отдаленных результатов лечения больных в зависимости от распространенности опухолевого процесса было установлено, что при отсутствии метастазов в регионарных лимфоузлах достоверных отличий не наблюдалось (табл. 2). На момент исследования при стадии $T_{2-3}N_0M_0$ были живы 87,5 % больных в 1 группе и 85,7 % во второй. Для этой группы больных медиана периода наблюдения (время от момента операции до 28 февраля 2010 г. или до смерти больного) составила 46 мес в 1 группе и 43 мес во второй ($p=0,27$).

Однако при наличии метастазов в регионарные лимфатические узлы и размерах опухоли больше 5 см проведение антибактериальной терапии до оперативного лечения достоверно увеличивало показатели выживаемости больных раком желудка. При раке желудка с метастазами в регионарные лимфатические узлы медиана периода наблюдения составила 43 мес. в 1 группе и 23 мес. во второй ($p=0,057$), а медиана безрецидивной выживаемости – 43 мес. и 14 мес. соответственно ($p=0,078$).

Что касается результатов лечения больных в зависимости от количества пораженных лимфоузлов, то небольшое количество больных в группах не позволило получить статистически значимых различий. Однако складывалось впечатление, что более благоприятный прогноз у больных 1 группы был при одиночных метастазах (1–2 лимфатических узла), нежели при их множественном поражении (3 и более лимфатических узла): выживаемость 85,7 % и 42,9 % соответственно ($p=0,234$). Для второй группы больных выживаемость при единичных метастазах составила 0 %, а при множественных метастазах – 26,7 %.

Таблица 1

Характеристика больных, получивших эрадикационную терапию в каждой группе

Критерий	1 группа n=30		2 группа n=29		p
	n	%	n	%	
Локализация опухоли в желудке					
Верхняя треть	6	20	7	24,1	0,94
Средняя треть	7	23,3	6	20,7	0,94
Нижняя треть	14	46,7	14	48,3	0,89
Тотальное и субтотальное поражение	3	10	2	6,9	0,96
Стадия заболевания					
T ₂ N ₀ M ₀	7	23,3	7	24,1	0,81
T ₃ N ₀ M ₀	9	30	7	24,1	0,82
T ₂₋₄ N ₁₋₂ *M ₀	13	43,4	15	51,7	0,89
T ₃ N ₂ M ₊	1	3,3	—	—	—
Размеры первичной опухоли					
До 2 см	5	16,7	3	10,4	0,74
От 2 до 5 см	16	53,3	13	44,8	0,69
Больше 5 см	6	20	11	37,9	0,22
Тотальное и субтотальное поражение	3	10	2	6,9	0,96
Поражение лимфоузлов метастазами					
Без метастазов	16	53,3	14	48,3	0,90
1 лимфоузел	4	13,3	3	10,3	0,96
2 лимфоузла	2	6,7	4	13,8	0,64
3 лимфоузла и больше	8	26,7	8	27,6	0,83
Гистологическая структура опухоли					
Высокодифференцированная аденокарцинома	7	23,3	3	10,3	0,32
Умереннодифференцированная аденокарцинома	10	33,4	12	41,5	0,71
Низкодифференцированная аденокарцинома и недифференцированный рак	7	23,3	8	27,6	0,94
Перстневидно-клеточный рак	6	20	3	10,3	0,5
Другие	0	—	3	10,3	—
* у больного перстневидно-клеточным раком желудка T ₃ N ₂ M ₊ имела место диссеминация опухоли по брюшине					

Таблица 2

Сравнительный анализ выживаемости больных в зависимости от распространенности опухолевого процесса

Критерий	1 группа, n=30			2 группа, n=29			p
	n	n1	%	n	n1	%	
Стадия заболевания							
T ₂ N ₀ M ₀	7	7	100	7	7	100	–
T ₃ N ₀ M ₀	9	7	77,8	7	5	71,4	0,772
T ₂₋₄ N ₁₋₂	14	9	64,2	15	2	13,3	0,015*
Размеры первичной опухоли							
До 2 см	5	4	80	3	2	66,7	0,672
От 2 до 5 см	16	12	75	13	9	69,2	0,944
Больше 5 см*	9	7	77,8	13	3	23,1	0,036*
Количество лимфоузлов с метастазами							
Без метастазов	16	14	87,5	14	12	85,7	0,694
1 лимфоузел	4	3	75	3	0	0	0,225
2 лимфоузла	3	3	100	4	0	0	0,061
3 лимфоузла	1	0	0	1	1	12,5	–
> 3 лимфоузлов	6	3	50	7	1	14,3	0,431

n – всего больных в группе; n1 – из них живы;

*различия в группах статистически значимы.

Таблица 3

Одно-, двух-, и трехгодичная общая и безрецидивная выживаемость больных с метастазами в регионарных лимфатических узлах

Выживаемость, %	1 группа (n=14)	2 группа (n=15)	p
Одногодичная	100	73,3	0,123
Общая			
Безрецидивная	85,7	66,7	0,447
Двухгодичная	85,7	40	0,031*
Общая*			
Безрецидивная*	64,2	20	0,042*
Трехгодичная	64,2	13,3	0,015*
Общая*			
Безрецидивная*	57,1	13,3	0,037*

*различия в группах статистически значимы

Различия между группами были статистически значимыми только в случае больных с единичными метастазами в регионарных лимфатических узлах ($p=0,007$ и $p=0,909$ соответственно при единичных и множественных метастазах в регионарных лимфоузлах). Мы сравнили одно-, двух-, и трехгодичную общую и безрецидивную выживаемость больных с метастазами в регионарных лимфатических узлах в обеих группах. Результаты приведены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что при наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах больные раком желудка, получившие до операции курс антибактериальной терапии, имели достоверно лучшие показатели как общей, так и безрецидивной выживаемости. Различия в выживаемости отмечались уже в первый год после операции и становились статистически значимыми во второй и третий год после проведенного лечения. Полученные результаты могут быть объяснены противовоспалительным эффектом проводимой антибактериальной терапии. Клинические исследования последних лет свидетельствуют о том, что воспалительная инфильтрация стромы опухоли и окружающих тканей может иметь важное прогностическое значение и влиять на отдаленные результаты лечения. Так, при раке мочевого пузыря [2], раке молочной железы [3], раке эндометрия [1] отмечено, что выраженная воспалительная инфильтрация стромы опухоли может отражать ее агрессивный потенциал, склонность опухоли к лимфогенному и гематогенному метастазированию. В основе указанных процессов, возможно, лежит активация процессов опухолевого ангиогенеза цитокинами воспаления. Широкий спектр фармакологических эффектов, в частности локальное подавление миграции воспалительных клеток, нейтрализации активных форм кислорода и подавления продукции провоспалительных цитокинов, присущий некоторым антибиотикам (в частности – кларитромицину и др.), может быть причиной

полученных различий в лечении больных получающих и не получающих антибактериальную терапию. Определенное значение может иметь и наличие у некоторых макролидных антибиотиков способности угнетать процессы неопластического ангиогенеза [6].

Также необходимо отметить, что одним из ведущих механизмов развития воспалительных изменений в слизистой желудка является хеликобактерная инфекция.

Установлено, что инфицирование больных *Helicobacter pylori* сопровождается активацией процессов ангиогенеза в слизистой желудка [9].

Проведение до операции антибактериальной терапии, направленной, в первую очередь, на эрадикацию *Helicobacter pylori*, существенно влияет на выраженность воспалительных изменений в слизистой желудка. Нами было установлено достоверное снижение числа клеток воспалительного инфильтрата в слизистой желудка у больных раком желудка, получавших до операции антибактериальную терапию [15]. Однако мы не выявили различий в выраженности воспалительных изменений в слизистой желудка в зависимости от степени инфицированности больных *Helicobacter pylori*.

Это может свидетельствовать, что в развитии воспалительных изменений могут играть роль и иные факторы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что больные раком желудка с метастазами в регионарных лимфатических узлах, получавшие до операции антибактериальную терапию имели достоверно лучшие показатели общей и безрецидивной выживаемости.

Считаем необходимыми дальнейшие исследования для уточнения роли инфекции в развитии воспалительных изменений в слизистой желудка, влияния ее на факторы прогрессии рака желудка и целесообразности применения антибактериальной терапии у пациентов с инвазивными формами заболевания.

Литература

1. Адамян Л.В., Глякин Д.С., Самойлова А.В., Гунин А.Г. Воспалительный процесс в этиологии и патогенезе рака эндометрия // Проблемы репродукции. – 2007. – № 1. – С. 21–5.
2. Аль-Шукри А.С., Корнеев И.А., Аль-Шукри С.Х. Изучение прогностической ценности клеток-эффекторов стромы переходноклеточных карцином мочевого пузыря // Онкоурология. – 2007. – № 4. – С. 26–30.
3. Вторушин С.В., Завьялова М.В. Зависимость гематогенного метастазирования... // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – прил. № 1. – С. 61–2.
4. Cai X. et al. H. felis eradication... // Gastroenterology. – 2005. – 128(7). – P. 1937–52.
5. Fukase K., Kato M., Kikuchi S. et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial // Lancet. – 2008. – 372(9636). – P. 392–7.
6. Hirata T. и др. Подавление кларитромицином синдрома системного воспалительного ответа после операций по поводу рака легкого и молочной железы // Инфекции в хирургии. – 2009. – № 4. – С. 34–42.
7. Hong S.S., Jung H.Y., Choi K.D. et al. A prospective analysis of low-grade gastric malt lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication // Helicobacter. – 2006. – 11(6). – P. 569–73.
8. Kim J.S. et al. *Helicobacter pylori* eradication for... // Br. J. Cancer. – 2007. – 96(9). – P. 1324–8.
9. Kovaliova O.I., Khomeriki S.G., Lazebnik L.B. Markers of angiogenesis in gastric mucosa in patients with H. pylori-associated chronic gastritis // Helicobacter. – 2010. – 15(4). – P. 352–3.
10. Mikasa K., Sawaki M., Kita E. et al. Significant survival benefit to patients with advanced non-small-cell lung cancer from treatment with clarithromycin // Chemotherapy. – 1997. – 43(4). – P. 288–96.
11. Morris T.C. et al. Clarithromycin with low dose dexamethasone and thalidomide is effective therapy in relapsed/refractory myeloma // Br J Haematol. – 2008. – 143(3). – P. 349–54.
12. Murakawa Y. et al. Suppressive effects of clarithromycin and cyclooxygenase-2 inhibitor... // Jpn J Antibiot. – 2001. – 54. – P. 53–8.
13. Sassa K., Mizushima Y., Tujishima T. et al. Clarithromycin: effect of a new macrolide antibiotic on a transplanted tumor in rats // Antimicrob Agents Chemother. – 1999. – 43(1). – P. 67–72.
14. Sauter C., Blum S. Regression of lung lesions in Hodgkin's disease by antibiotics: case report and hypothesis on the etiology of Hodgkin's disease // Am J Clin Oncol. – 2003. – 26(1). – P. 92–4.
15. Senchukova M. et al. The special features of gastric mucosal inflammation in patient with gastric cancer infected by H. pylori // Helicobacter. – 2010. – 15(4). – P. 383–4.
16. Yatsunami J., et al. Roxithromycin and clarithromycin, 14-membered ring macrolides, potentiate the antitumor activity of cytotoxic agents against mouse B16 melanoma cells // Cancer Lett. – 1999. – 147(1–2). – P. 17–24.

УДК 616.33-006.6-089.87:576.358.5

*А.Г. Барышев***ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА
В СВЕТЕ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛИ***ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Росздрава, Краснодар***Контактная информация:***Барышев Александр Геннадиевич, доцент кафедры онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС***адрес:** 350004, г. Краснодар, ул. Седина, 4; **тел.** +7(988)247-88-91**e-mail:** sashapurlev@mail.ru

Статья поступила 22.04.2010, принята к печати 18.03.2011.

Резюме

Работа посвящена изучению результатов гастрэктомии, выполненной по поводу рака желудка с объемами лимфодиссекции D₁ и D₂ во взаимосвязи с биологическими особенностями опухоли – наличием рецепторов c-erbB-2 (HER2) и VEGF.

Ключевые слова: гастрэктомия, рак желудка, экспрессия c-erbB-2 (HER2), VEGF.*A.G. Baryshev***THE EXTERNAL TREATMENT RESULTS
OF GASTRIC CANCER INSPIRE WITH TUMORS BIMOLECULAR CHARACTERISTICS***Kuban State Medical University, oncology department with thoracic surgery course, Krasnodar***Abstract**

In this study we analyzed the gastrectomy results which were performed due to stomach cancer with lymph dissection volume D₁ and D₂ in correlation with biomolecular tumor characteristics – c-erbB-2 (HER-2) and VEGF receptors presence.

Key words: gastrectomy, stomach cancer, c-erbB-2 (HER-2) and VEGFR expression.**Введение**

Ежегодно в мире диагностируется около 800 000 новых случаев рака желудка (РЖ). Несмотря на стойкое снижение заболеваемости и нынешнее 4 место в этом печальном списке, blastoma желудка продолжает оставаться второй как причина смертности от онкопатологии, что составляет примерно 10 % от общего числа летальных исходов, связанных с карциномами [9]. Плохой прогноз РЖ объясним, с одной стороны, поздней диагностикой заболевания, а с другой, – агрессивным характером течения опухолевого процесса [1]. В Европе и США 5-летняя выживаемость не превышает 15 %. В Японии, которая является лидером по заболеваемости – 114,7 на 100 000 населения, половина заболевших РЖ преодолевает 5-летний рубеж – благодаря тщательной диспансеризации, позволяющей осуществлять раннюю и своевременную диагностику, а также наблюдению стандартов лечения [8].

Одними из важнейших факторов, определяющих развитие РЖ, являются изменения в слизистой на молекулярном уровне и связаны они с активацией онкогенов и патологией генов супрессоров, в частности – гена p53, который подвергается инактивации из-за микромутаций или вследствие делеции соответствующего локуса хромосомы 17 [6; 11]. Почти у половины больных РЖ встречается гиперэкспрессия гена, кодирующего эпидермальный фактор роста – EGFR (HER1), у 10–15 % пациентов – его гомолог – c-erbB-2 (HER2) [2; 4; 7]. Амплификация и экспрессия этого гена чаще всего наблюдается в карциноме молочной железы и редко определяется в опухолях других локализаций. Кроме этого, прогрессия практически всех новообразований обуслов-

лена развитием сосудистой системы опухоли. Главным регулятором этого процесса является сосудистый фактор роста (VEGF). Наличие HER2–рецепторов на поверхности опухолевой клетки РЖ, а также гиперэкспрессия VEGF сочетается с плохим прогнозом заболевания [5]. В этой связи мы изучили результаты 5-летней выживаемости больных, которым по поводу РЖ выполнялась гастрэктомия со стандартной (D₁) и расширенной (D₂) лимфодиссекцией (ЛД), определив ретроспективно молекулярные особенности опухолей.

Цель исследования – изучить влияние расширенной лимфодиссекции (D₂) и рецепторного статуса опухоли, c-erbB-2 (HER2) и VEGF, на отдаленные результаты лечения больных РЖ, которым выполнялась гастрэктомия.

Материалы и методы

Ретроспективно оценены результаты 296 гастрэктомий (ГЭ) с лимфодиссекцией D₁ (группа 1), выполненных с 1993 по 1997 г. и 347 расширенных ГЭ с лимфодиссекцией D₂ (группа 2), сделанных в 2001–2004 гг. Для обеспечения «чистоты» проводимого исследования в него не были включены пациенты, которым ГЭ производилась в 1998–2000 гг., потому что в этот период проходило освоение методики выполнения расширенной лимфодиссекции (РЛ), менялась техника мобилизации желудка, не были до конца отработаны и не всегда соблюдались единые стандарты при проведении хирургического вмешательства. Изучаемые группы больных сопоставимы по распространенности опухолевого процесса, возрасту и полу (табл. 1).

Таблица 1

Распределение больных по стадии заболевания, полу и возрасту

Стадия	п больных (м/ж)		Возраст (лет).											
			30–39		40–49		50–59		60–69		70–79		80–89	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
I	15/13	8/10	0/0	1/1	1/0	1/2	3/2	4/2	8/7	2/3	3/4	0/2	0/0	0/0
II	21/20	40/39	0/0	3/2	1/1	4/3	5/3	12/11	9/9	15/16	5/7	5/5	1/0	1/2
III	175/36	161/51	1/0	0/1	5/2	7/3	38/6	44/9	98/19	81/26	32/8	29/10	1/1	0/2
IV	10/6	26/12	1/1	0/0	1/1	3/1	5/3	8/3	2/1	13/5	1/0	2/3	0/0	0/0
Всего	221/75	235/112	2/1	4/4	8/4	15/9	51/14	68/25	117/36	111/50	41/19	36/20	2/1	1/4

Надо отметить, что техника ГЭ в группах отличалась, поскольку в 1990-е гг. не было однозначного мнения о необходимости стандартного выполнения РЛ. При проведении операции в 1 группе процесс мобилизации органа начинали с отделения большого сальника от поперечно-ободочной кишки и рассечения желудочно-ободочной связки, после чего выходили на поджелудочно-желудочную связку, обрабатывали коллектор левой желудочной артерии, перевязывая и пересекая коронарную вену и левую желудочную артерию. Далее обрабатывали левые желудочно-сальниковые сосуды, желудочно-селезеночную связку, правые желудочные и желудочно-сальниковые сосуды. Во второй группе пациентов мобилизацию желудка проводили иначе: изначально рассекали брюшину с одновременной лимфодиссекцией от печеночного изгиба ободочной кишки по краю двенадцатиперстной кишки и далее по печеночно-двенадцатиперстной связке, отделяли от печени малый сальник до кардии, затем вскрывали брюшину по переднему краю правой ножки диафрагмы и ниже, к чревному стволу. После перевязки правой желудочной артерии, проводилась лимфодиссекция по ходу печеночной артерии, чревного ствола, селезеночной артерии, ворот селезенки, отдельно перевязывались коронарная вена и левая желудочная артерия. После этого большой сальник отделялся от поперечно-ободочной кишки и обрабатывались желудочно-сальниковые сосуды. В итоге при выполнении расширенной ГЭ с ЛД D₂ нами удалены следующие группы лимфоузлов: перигастральные, по ходу печеночной артерии, чревного ствола, селезеночной артерии, в воротах селезенки, ретропанкреатодуоденальные, печеночно-12-перстной связки, а лимфатические пути аорто-кавального промежутка и в воротах левой почки – при локализации опухоли в антральном отделе желудка.

Ретроспективно двойным слепым методом были отобраны 104 пациента (по 52 в каждой группе), у которых по гистопрепаратам определялся уровень содержания в опухоли c-erbB-2 (HER2) и VEGF. На депарафинированный срез с ткани опухоли, зафиксированный на предметном стекле и покрытый специальным адгезивом, наносился на 5 минут раствор перекиси водорода, затем стекла промывались в фосфатном буфере. Срезы на стеклах прогревались в буфере для демаскировки антигенов в СВЧ-печи. Наносились первичные антитела к исследуемым антигенам (рецепторам к HER2/neu и VEGF). После инкубации стекла промывались в фосфатном буфере, и наносился реагент для визуализации (использовались реагенты фирм «DAKO» и «DBS»). После чего стекла обрабатывались хромогеном DAB, который выпадает в нерастворимый осадок коричневого цвета в области образования иммунных комплексов на срезах ткани. Срезы докрашивались гематоксилином, обезживались и заключались в специальную покрываю-

щую среду. В световом микроскопе образцы изучались при увеличении $\times 400$ – 1200 . Гиперэкспрессия HER-2/neu интерпретировалась по количеству и интенсивности окраски мембран раковых клеток. Результат определялся по бальной системе как отрицательный (0), 1⁺, 2⁺, 3⁺ в соответствии с международными критериями. Результат экспрессии VEGF определялся по интенсивности окрашивания: 1) отрицательный (отсутствие окрашивания (0), слабopоложительный (+)), 2) положительный (умеренно положительный (++)), сильно выраженный (+++)). Иммуногистохимическое изучение тканей, фиксированных в формалине и заключенных в парафин, было до последнего времени методологически затруднено в связи с трудностями стандартизации результатов. Однако благодаря тест-системе для оценки экспрессии белка HER-2, – HercepTest for Immunoenzymatic Staining, Dako Corp, Carpinteria, CA – которая была нами применена в исследовании, чувствительность и специфичность результатов были достоверны. По данным T.W. Jacobs et al. совпадение результатов иммуногистохимического изучения парафиновых блоков с данными флуорисцентной гибридизации *in situ* наблюдается в 90 % случаев [3].

Результаты и обсуждение

При изучении отдаленных результатов лечения РЖ имеется положительный эффект стандартного выполнения ЛД D₂ по сравнению с ЛД D₁: в первой группе общая 5-летняя выживаемость составила 41,5 %, во второй – 53,6 % (p<0,05). Неадекватный объем ЛД D₁ и принятая в 1990-е гг. техника мобилизации желудка, с одной стороны, не обеспечивали полноценного радикализма хирургического вмешательства у пациентов 1 группы, а с другой, – не давали правильного представления о распространенности опухолевого процесса (феномен «миграции стадии – Will Rogers»).

Надо отметить, что в исследование по изучению результатов ГЭ с ЛД D₂ были включены пациенты, которым данная операция проводилась в 2001–2004 гг., когда она стала рассматриваться нами как рутинное хирургическое вмешательство и выполнялась стандартно всеми хирургами специализированного онкологического отделения.

За предшествующие 3 года освоения методики проведения РЛ был получен практический опыт, который позволил с высокой вероятностью ожидать удовлетворительных ближайших и отдаленных результатов.

Во многом это было связано с увеличением количества, выполняемых в отделении за год ГЭ (более 120). Качественный результат этой операции, как утверждают T. Sano et al.[10], зафиксирован в тех лечебных учреждениях, где делается не менее 80 операций в год, и суммарный опыт оперирующих хирургов не менее 100 ГЭ.

Таблица 2

Отдаленные результаты лечения больных РЖ в зависимости от объема лимфодиссекции

5-летняя выживаемость (%)						
Стадия	Группа 1 ♂	Группа 2 ♂	p	Группа 1 ♀	Группа 2 ♀	p
I	73,3	75,0	>0,05	76,9	85,5	>0,05
II	61,9	77,5	>0,05	65,0	76,9	>0,05
III	35,4	48,5	<0,05	36,1	49,0	<0,05
IV	0	19,2	<0,05	0	16,6	<0,05

Таблица 3

Результаты изучения рецепторного статуса больных РЖ

Наличие рецепторов в опухоли	Группа 1	Группа 2	p
HER2	12 (23%)	11 (21,1%)	>0,05
VEGF	25 (48%)	24 (46,1%)	>0,05

Таблица 4

Выживаемость больных РЖ в связи с наличием VEGF рецепторов и регионарным метастазированием

Медиана выживаемости						
Группа 1				Группа 2		
VEGF	N ₁	N ₂	p	N ₁	N ₂	p
VEGF ⁻	23,0±2,1	10,2±1,4	<0,05	27,8±2,3	11,7±1,5	<0,05
VEGF ⁺	16,4±1,1	8,0±0,8	<0,05	18,0±1,3	8,5±1,0	<0,05

Преимущество расширенных операций больше отразилось в группах пациентов с распространенным раком (табл. 2).

Невысокая 5-летняя выживаемость в I стадии заболевания обусловлена небольшой численностью больных в этой группе, что затрудняет получение достоверного результата.

Надо отметить, что при сопоставлении показателей 5-летней выживаемости больных в 1 и 2 группах нами получен результат, позволяющий говорить о преимуществах ГЭ с РЛ D₂, что больше проявилось при распространенных стадиях заболевания.

При изучении молекулярных особенностей опухолей в первой группе обнаружена положительная экспрессия:

- HER2 у 12 (23,0 %)
- VEGF у 25 (48,0 %),
- во второй группе соответственно – у 11(21,1 %) и 24 (46,1 %) (табл. 3).

Надо отметить, что большинство случаев обнаружения экспрессии VEGF в обеих группах (1/2) соответственно: 20 (80,0 %) / 22 (91,6 %) прямо коррелировало с поражением лимфатических узлов, т.е. это были пациенты с III A и III B стадиями.

Медиана выживаемости в 1/2 группах с N₁ и отрицательными VEGF рецепторами составила:

- 23,0±2,1/27,8±2,3 мес (p>0,05),
- у пациентов с N₁ и экспрессией VEGF рецепторов соответственно – 16,4±1,1мес/18,0±1,3 мес (p>0,05),
- у больных с N₂ без рецепторов VEGF – соответственно 10,2±1,4мес/11,7±1,5 мес (p>0,05),
- при экспрессии VEGF рецепторов – 8,0±0,8мес/8,5±1,0 (p>0,05).

Литература

1. Berrino F. The EURO CARE Study: strengths, limitations and perspectives of population-based, comparative survival studies // Ann Oncol. – 2003. – 14(5). – P. 9–13.
2. Galizia G., Lieto F., Orditura M. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery // World J. Surg. – 2007. – 31. – P. 1458–68.

При сопоставлении медианы выживаемости достоверно хуже (p<0,05) результат лечения у пациентов с N₂ распространенностью регионарного метастазирования независимо от рецепторного статуса по VEGF (табл. 4). Надо отметить, что у большинства пациентов с экспрессией HER2 в обеих группах, – 9 (75,0 %)/8 (72,7 %) (p>0,05), при изучении характера прогрессирования заболевания было установлено развитие канцероматоза брюшной полости. В обеих группах не было определено достоверной взаимосвязи уровня экспрессии HER2 и VEGF с гистологической структурой опухоли, стадией процесса.

Заключение

Улучшение отдаленных результатов лечения у пациентов во 2 группе, которое больше отмечено при III и IV стадиях заболевания, связано с адекватным стадированием и непосредственной эффективностью расширенной ГЭ с ЛД D₂. Экспрессия c-erbB-2 (HER2) и VEGF возможна при любой стадии и гистологической структуре опухоли, чаще сочетается с лимфогенным метастазированием и последующим имплантационным распространением. Ухудшение отдаленных результатов лечения РЖ достоверно отмечено у больных с N₁ при положительном VEGF рецепторном статусе, а также независимо от наличия рецепторов при регионарных лимфогенных метастазах N₂.

Изучение молекулярно-биологических особенностей опухоли необходимо для адекватной оценки возможных перспектив прогрессии для индивидуализации лечения и аргументированного применения комплексного метода на ранних стадиях РЖ. Это с одной стороны, при адекватной лекарственной терапии позволит надеяться на улучшение отдаленных результатов, а с другой, – позволит избежать неоправданных экономических потерь при необоснованном назначении дорогостоящих медикаментов.

3. Jacobs T.W., Gown A.M., Yaziji H. et al. Comparison of Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer // J Clin Oncol. – 1999. – 17. – P. 1974–82.
4. Johnson S.M., Evers B.M. Translational research in gastric malignancy // Surg. Oncol. Clin. N. Am. – 2008. – 17. – P. 323–40.
5. Lieto E., Ferraccio F., Orditura M. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients // Ann.Surg.Oncol. – 2008. – 15. – P. 69–79.
6. Panani A.D. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications // Cancer Lett. – 2008. – 266. – P. 99–115.
7. Park D.I., Jun J.W., Park I.H. et al. Her-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer // Dig Dis Sci. – 2006. – 51. – P. 1371–9.
8. Parkin D., Pisani P., Ferley J. et al. Global cancer statistics // Ca. Cancer J. Clin. – 1999. – 49. – P. 33–64.
9. Parkin D.M. International variation // Oncogene. – 2004. – 23. – P. 6329–40.
10. Sano T., Sasako M. For the Gastric Cancer Surgical Study Group of the Japan Clinical Oncology Group (JCOG) "Randomised controlled trial to evaluate para aortic lymphadenectomy for gastric cancer (JCOG9501) // IV th International Gastric Cancer Congress, 2001. – Abstr. S45. – P. 663.
11. Smith M.G., Hold G.L., Tabara E., El-Omar E.M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer // World J. Gastroenterol. – 2006. – 12. – P. 2979–90.

Информационное письмо № 1

III Всероссийская научная конференция с международным участием «Наноонкология», САРАТОВ, 6–7 СЕНТЯБРЯ 2011 г.

Глубокоуважаемые коллеги!

Нанотехнологическое общество России,
Российская академия медицинских наук, РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН,
Российская академия наук,
Министерство промышленности и энергетики Саратовской области,
Саратовский научный центр РАН,
Учреждение Российской академии наук,
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН),
ГОУ ВПО Саратовский Государственный Университет имени Н.Г. Чернышевского,
ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
6–7 сентября 2011 года проводят

III Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Наноонкология»

Регистрация участников и срок подачи тезисов строго до 01 июля 2011 г.

Правила оформления тезисов:

- объем тезисов не должен превышать 1 страницы машинописного текста (A4);
- в **начале** следует указать инициалы и фамилии авторов, **затем** – название тезисов,
- **потом** – название учреждения;
- текст должен быть набран шрифтом Times New Roman 12, через полуторный интервал; ширина полей: левое – 30 мм, верхнее – 20 мм, правое – 15 мм, нижнее – 20 мм; текст должен быть выровнен по левому краю, не содержать переносов;
- тезисы должны содержать следующие разделы: **задачи исследования, материалы и методы, результаты и выводы**;
- текст должен быть отредактирован и представлен в электронном виде.

Тезисы и заполненную регистрационную форму необходимо выслать секретарю Оргкомитета Решетниковой В.В. по электронной почте: nanoconference2011@rambler.ru



ВПЕРВЫЕ!
Русскоязычная версия!

Группа компаний «СвитЧайлд» –
единственный в России представитель крупнейшего
издательского холдинга «OXFORD PRESS»

ПРЕДСТАВЛЯЕТ

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ОНКОЛОГИИ

Annals of Oncology



Многоотраслевой журнал,
публикующий статьи
по медицинской онкологии,
хирургии, радиотерапии,
ведиатрической онкологии,
а также по лечению
и сопроводительной поддержке
пациентов, включая
эмоциональные опухоли.
Официальный журнал
Европейского общества
медицинской онкологии
(European Society for Medical
Oncology)
и с 2008 года Японского
общества медицинской
онкологии (Japanese Society
of Medical Oncology).



Председатель редакционного совета

М.И. Давидов, президент Российской Академии медицинских наук, академик РАН и РАМН, профессор,
директор научно-исследовательского института клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

ВНИМАНИЕ! ПОДПИСКА!

тел.: +7 (495) 608-25-45 (доб. 114)

www.humrep.ru

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН





Самуил Петрович Ярмоненко
18.03.1920 г. – 13.03.2011 г.

13 марта ушёл из жизни Главный научный сотрудник Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, д.б.н., профессор, лауреат государственной премии СССР Самуил Петрович Ярмоненко.

С.П. Ярмоненко окончил Куйбышевскую Военно-медицинскую академию в июне 1941 г. и уже через месяц вступил в должность младшего врача полка «десантной» кавалерийской дивизии, созданной для рейдов в тылу наступавшей немецкой армии.

Участвовал в боях при обороне Донбасса и Кавказа, в Керченском десанте на Крымский полуостров и в его последующем освобождении, в боях на Украине, затем в Польше, Венгрии, Австрии и Чехии. Великую Отечественную войну закончил 25-летним подполковником медицинской службы. Награжден орденами Отечественной войны I и II степени, тремя орденами Красной звезды и 19 медалями.

После войны направлен в медслужбу Военного института иностранных языков, а с 1952 г. занялся научной деятельностью на кафедре патологии и терапии радиационных поражений Военного факультета при ЦИУ врачей. В последующем занимался вопросами противолучевой защиты в НИИ военной медицины и в Институте гигиены труда и профзаболеваний, где защитил докторскую диссертацию по радиозащитным препаратам.

В 1967 г. С.П. Ярмоненко приглашен Н.Н. Блохиным в Институт экспериментальной и клинической онкологии АМН руководителем лаборатории радиобиологии. Под его руководством сотрудники занимались изучением биологического действия новых для лучевой терапии излучений – ускоренных протонов, тяжелых ионов и нейтронов, и разработкой комбинированных методов терапии опухолей: терморрадиотерапии и сочетания облучения с химиопрепаратами и блокаторами неоангиогенеза.

В последние годы С.П. Ярмоненко большое внимание уделял изучению канцерогенного эффекта ионизирующих излучений, воздействующих на человека при добыче и переработке урана и его использовании в атомной энергетике, а также при аварийных ситуациях.

С.П. Ярмоненко – автор одного из лучших учебных пособий для студентов медицинских и биологических институтов «Радиобиология человека и животных», выдержавшего четыре издания и переведенного на английский язык. Фундаментальные вопросы радиобиологии и лучевой терапии опухолей отражены в нескольких научно-популярных книгах, также переведенных за рубежом. В 2008 г. вышла интереснейшая книга мемуаров Самуила Петровича «Преодоление», в которой он описывает и пережитые им и его поколением труднейшие этапы жизни страны, и радость от плодотворной научной деятельности, и многочисленные встречи с учеными всех республик Советского Союза и ведущими радиоонкологами зарубежья.

Светлый образ истинного патриота, крупного ученого и великого труженика навсегда останется в наших сердцах.

Коллектив Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН

Редакция «Российского биотерапевтического журнала»

Коллеги и друзья

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЛК – 5-аминолевулиновая кислота (δ -aminolevulinic acid)

АЛС – антилимфоцитарная сыворотка

АТГ – антитимоцитарный глобулин

АФК – активные формы кислорода

АЧН – абсолютное число нейтрофилов

БКС – бинарная каталитическая система

ВКМ – внеклеточный матрикс

БМ – базальная мембрана

ВРПС – водорастворимые полисахариды

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВМ – Васкулогенная мимикрия

ВЧД – внутричерепное давление

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

в/б – внутрибрюшинно

в/в – внутривенно

ГК – гепатоцеллюлярная карцинома

бГК – быстрорастущая дедифференцированная

гепатоцеллюлярная карцинома

мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная карцинома

ГПВ/GPV – гликопептидная противоопухолевая вакцина

(glycopeptide cancer vaccine

ДМБА – диметил- α -бензантрацена

ЗНО – злокачественные новообразования

ЗО – злокачественное образование

ИГХ – иммуногистохимия

ИДМ – иммунодефицитные мыши

ИФН- γ – интерферон гамма

КСФ – колониестимулирующий фактор

чГ-КСФ – человеческий колониестимулирующий

фактор

ЛТ – лучевая терапия

МИБТ – медицинские иммунобиологические препараты

МЛ – моноклеарные лейкоциты

ММ – метамиелоцит(ы)

МКА – моноклональные антитела

ММ – множественная миелома

МРЛ – мелкоклеточный рак легкого

ММП – матриксные металлопротеиназы

МРТ – магнитно-резонансная томография

НК – натуральные киллеры

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества

НПТ – наилучшая поддерживающая терапия

НСПВС – нестероидные противовоспалительные средства

НХЛ – неходжкинская лимфома

ОБО – объективный ответ

ОДС – оптическая диффузионная спектроскопия

ОО – отсутствие ответа

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОЦ – окисленный целлюлоз

ОЦК – объем циркулирующей крови

ОП – опухолевой плеврит

ОМ – опухолеассоциированные маркеры

РМЖ – рак молочной железы

МР РМЖ – местнораспространенный

рак молочной железы

ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма

рака молочной железы

РЭС – ретикулоэндотелиальная система

ПВП – поливинилпирролидон

ПД – пролиферация и дифференцировка

ПЗ – прогрессирование заболевания

ПО – полный ответ

ПОПР – полиоксипропилен

ПФОС – перфторорганические соединения

ППК – первичные половые клетки

ПК – периферическая кровь

ПХТ – полихимиотерапия

ПЯ – палочкоядерный

KPP – колоректальный рак

КЭР – кардиоэзофагеальный рак

РЖ – рак желудка

РКТ – рентгеновская компьютерная томография

РЛ – рак легкого

РМП – рак мочевого пузыря

РМЖ – рак молочной железы

РПК – рак прямой кишки

РПЖ – рак поджелудочной железы

РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов

РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками

РЧА – эффективность радиочастотной абляции

РШМ – рак шейки матки

СЗП – свежемороженая плазма

СПС – сосудисто-подобные структуры

СПЖ – средняя продолжительность жизни

СЯ – сегментоядерный

ТИМП – тканевые ингибиторы металлопротеиназ

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка

УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография

ФГА – фитогемагглютинин

ФД – флуоресцентная диагностика

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФС – фотосенс

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ФТС – фетальная телячья сыворотка

ХГ – хорионический гонадотропин

ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз

ХТ – химиотерапия

ЛСП – лимфосаркома Плисса

ЦП – цисплатин

ЦФ – циклофосфан

ЧО – частичный ответ

ШМ – шейка матки

ЭФР – эпидермальный фактор роста

ЭК – эндотелиальные клетки

ADMET – drug administration, distribution, metabolism, excretion,
and toxicological studies

ASCUS – atypical squamous cells of undetermined significance

BDFI – bioactivity-directed fractionation and isolation

CIN – cervical intraepithelial neoplasia

(цервикальные интраэпителиальные неоплазии)

COX – циклооксигеназа

CRC – colorectal cancer

EPR effect – enhanced permeability and retention effect

(эффект повышения проницаемости и удерживания)

FLICE – cellular Fas-associated death domain-like

interleukin-1beta-converting enzyme

GAP – Good Agricultural Practice

GMP – Good Manufacturing Practice

GCP – Good Clinical Practice

LDCI – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingardon

LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюиса)

LSIL – low-grade intraepithelial lesions

Mw – molecular weight (молекулярный вес)

NTA – nitril triacetate acid (нитрилтрехуксусная кислота)

IGFBP – insulin-like growth factor binding protein

HER – human epidermal growth factor receptor

HSIL – high-grade intraepithelial lesions

Ph – филадельфийская хромосома

TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor



К 60-летию Валерия Николаевича Чарушина

Валерий Николаевич Чарушин, доктор химических наук, профессор, действительный член РАН, директор института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН.

Основные научные исследования В.Н. Чарушина выполнены в области гетероциклической и медицинской химии. Он является соавтором более 500 научных работ, в том числе серии монографий, более 30 обзоров в авторитетных международных изданиях и свыше 40 патентов. В.Н. Чарушин внес существенный вклад в теорию и практику нуклеофильного замещения водорода, химию азагетероциклов, в том числе фторсодержащих, в развитие новых методологий синтеза конденсированных систем на основе различных сочетаний реакций присоединения, замещения водорода и других tandemных реакций, а также в изучение механизмов реакций и трансформаций гетероциклов с помощью ЯМР спектроскопии и ^{15}N -изотопных меток.

Работы В.Н. Чарушина, выполненные в течение последних лет, связаны с направленным синтезом высокоэнергетических соединений, эффективных гетероциклических лигандов для комплексов с металлами, а также биологически активных веществ.

Совместно с академиком РАН О.Н. Чупахиным и профессорами В.П. Красновым, Г.Л. Левит (ИОС УрО РАН) и А.Ю. Барышниковым (Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН) завершены работы по регистрации и внедрению в медицинскую практику противоопухолевого препарата «Лизомустин», который успешно применяется в клиниках РФ.

В.Н. Чарушин – признанный лидер в области синтеза фторсодержащих гетероциклов, в частности – фторхинолонов и других ингибиторов ДНК-гиразы. Им внесен весомый вклад в разработку промышленных способов синтеза целого семейства антибактериальных препаратов фторхинолонового ряда, таких как пefлоксацин и левофлоксацин (запатентован в Японии и Корее совместно с фирмой «Самсунг»). Осуществлен оригинальный синтез энантиомерно чистого антибактериального препарата нового поколения левофлоксацина, основанный на кинетическом разделении. Выполнен полный цикл работ по доклиническому изучению оригинального противовирусного препарата триазавирина, обладающего способностью защищать от ряда опасных для человека и животных вирусных инфекций, в том числе вирусов гриппа H5N1 и H1N1. Препарат успешно прошел I фазу клинических испытаний (2009). По данным Вирусологического центра МО РФ (г. Сергиев Посад) препарат эффективен в отношении особо опасных вирусных инфекций. Совместно с Академией наук Словакии и университетом Братиславы ведутся работы по изучению механизма его действия. Для отработки технологий и наработки опытных партий для клиники в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН созданы гибкие пилотные установки. Промышленное производство триазавирина осваивается заводом «Медсинтез» (г. Новоуральск Свердловской области).

В.Н. Чарушин ведет значительную научно-организационную и педагогическую работу. Он является членом Президиума РАН, председателем Уральского отделения РАН, членом Координационного совета по инновационным подходам к развитию вооружений, военной и специальной техники при Генеральном штабе ВС РФ; последние десять лет он неизменно входит в состав Оргкомитета Европейской конференции по органической химии, а также является членом редколлегий журналов «Успехи химии», “Mendeleev Communications”, «Известия академии наук, серия химическая», Журнала органической химии, «Макрогетероциклы», «Вестник Уральского отделения РАН» и ряда научных советов. Им сделано свыше 50 научных докладов, в том числе пленарные лекции на международных конференциях по химии гетероциклов в Стокгольме (2002 г.), Салониках (Греция, 2005), Палермо (Италия, 2006), II конференции по «зеленой» химии (Москва, 2008), а также доклады на XVII (Казань, 2003) и XVIII (Москва, 2007) Менделеевском съездах. Профессор В.Н. Чарушин активно участвует в совместных проектах с университетами Великобритании, Германии, Нидерландов и других стран. Им подготовлено 18 кандидатов и 2 доктора наук.

В.Н. Чарушин награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» IV степени (2001 г.), Орденом Почета (2008 г.). Он лауреат премий имени академика И.Я. Постовского УрО РАН (2004 г.), Международного академического издательства “Наука” (1998 и 2008 г.), а также имени В.Н. Татищева и Г.В. де Геннина (г. Екатеринбург, 2008).

В день юбилея сердечно поздравляем Валерий Николаевича, желаем ему здоровья и новых научных достижений.

*Коллеги и друзья
Редакция «Российского биотерапевтического журнала»*

Рисунок к статье Ю.А. Рагулина и соавт.
«СОЧЕТАННАЯ ФДТ И ЛТ В ЛЕЧЕНИИ РАКА ЛЕГКОГО»

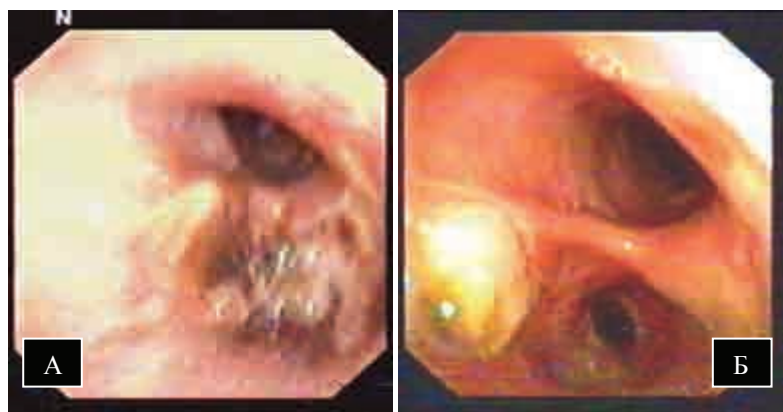


Рис. 2. Центральный рак правого легкого. Бронхоскопия, эндофото:

А: до лечения, экзофитный компонент опухоли обтурирует правый главный бронх;
Б: через 5 нед. после ФДТ, полная регрессия опухоли, восстановление просвета правого главного бронха.

Рисунок к статье Н.А. Пятаева и соавт.
«ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ДОКСОРУБИЦИНА
ПРИ ВВЕДЕНИИ В ФОРМЕ КОНЬЮГАТА С ДНК
У КРЫС С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМой РС-1 »



Рис. 2. Фотографии опухолей средних размеров в группах (слева направо):

- 1 – контрольная;
- 2 – 2 опытная (конъюгат деринат-доксорубин 1 мг/кг);
- 3 – 1 (доксорубин 1 мг/кг) и 3 опытная (конъюгат деринат-доксорубин 2 мг/кг);
- 4 – (конъюгат деринат-доксорубин 4 мг/кг);
- 5 – только деринат.

Рисунок к статье Т.А. Маньчевой и соавт.

**«МЕЛАТОНИН И МЕТФОРМИН ПОДАВЛЯЮТ ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ
ПРИ ИНДУЦИРОВАННЫХ БЕНЗ(А)ПИРЕНОМ НЕОПЛАЗИЯХ У МЫШЕЙ »**



Рис. 1. Папилломы кожи у мыши контрольной группы (начальная стадия развития).



Рис. 2. Опухолевидное образование с явлениями гиперкератоза у мыши контрольной группы.



Рис. 3. Распад опухолевых узлов с формированием язвенных дефектов у мыши контрольной группы.



Рис. 4. Рак кожи с явлениями распада и изъязвления у мыши контрольной группы.

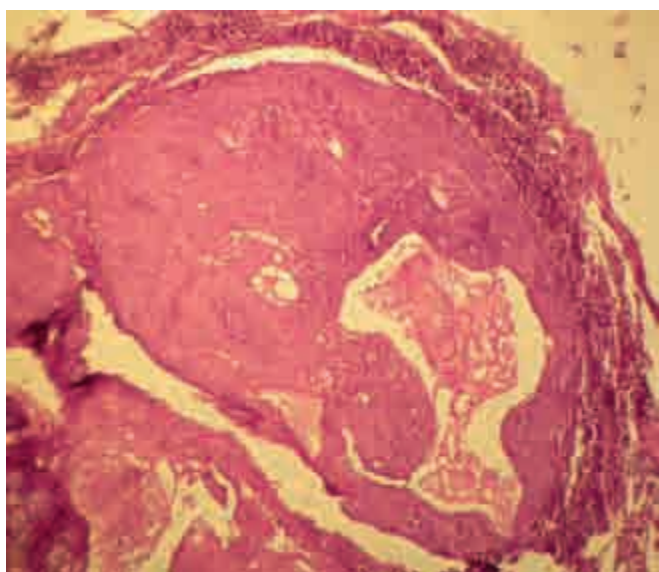


Рис. 5. Папиллома кожи мыши контрольной группы с очагами гиперкератоза и некротическими изменениями. Окраска гематоксилин-эозин, $\times 100$.

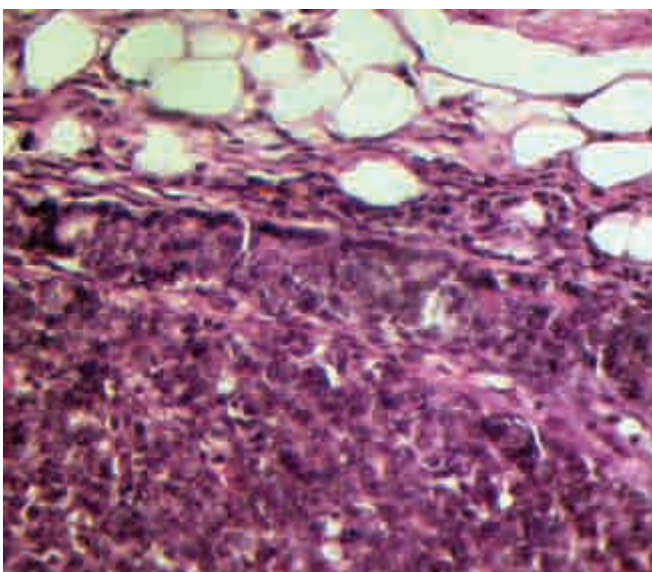


Рис. 6. Низкодифференцированный плоскоклеточный рак кожи (неороговевающий) мыши контрольной группы. Окраска гематоксилин-эозин, $\times 100$.

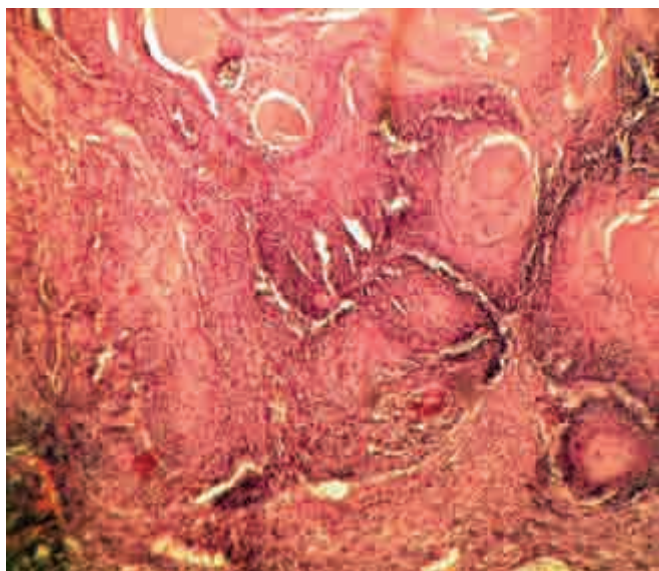


Рис. 7. Плоскоклеточный рак кожи мыши контрольной группы с очагами ороговения. Окраска гематоксилин-эозин, $\times 100$.

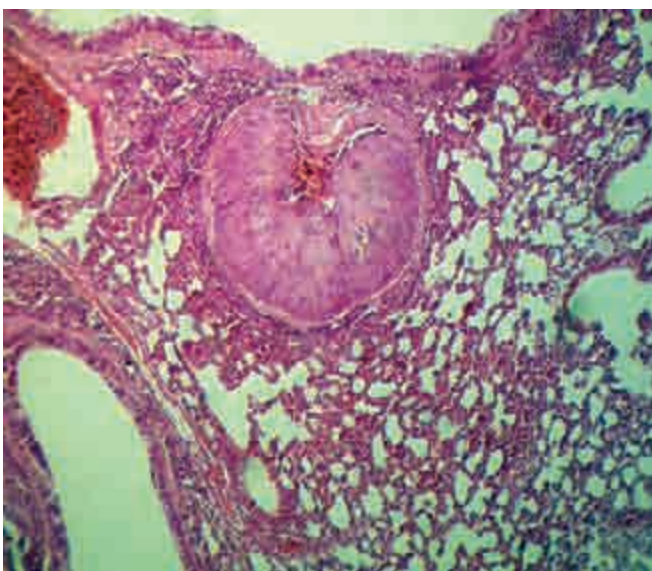


Рис. 8. Метастаз плоскоклеточного рака в легкое. Опухолевый эмбол. Окраска гематоксилин-эозин, $\times 100$.