

HIGH
BINDING
AFFINITY



РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
RUSSIAN JOURNAL OF BIOTHERAPY
4/2010 ISSN 1726-9784

Благодаря уникальным фармакологическим свойствам,
именно **Эпрекс** способен обеспечить необходимый
уровень гемоглобина для Вас и Ваших пациентов

- Высокое сродство к рецепторам и короткий период полувыведения Эпрекса обеспечивает оптимальную эффективность и безопасность ¹⁻³
- Эффективность и безопасность воспроизведенных рекомбинантных эритропоэтинов непредсказуемы ⁴

¹ Jellmann W. Business Briefing: European Kidney & Urological Diseases 2005, extract 1-6;

² Egrie et al. Nephrol Dial Transplant 2001; 16 (Suppl 3): 3-13.

³ Wüzig TF et al. JCO 2005; 23: 2606-17.

⁴ Singh AK. Poster presented at the World Congress of Nephrology, 21-25 April 2007, Rio de Janeiro, Brazil



Будь уверен. Проверен.

* Высокое сродство к рецепторам.
За дополнительной информацией о препарате просьба обращаться в представительство "Янссен Фармацевтика Н. В." по адресу:
121614 Москва, ул. Крылатская, д.17, корп. 3, тел.: (495) 755-83-67, факс (495) 755-83-68

на правах рекламы
JC-RUS/Эр-Омко/2008/Эпре/376/01
П №013583/01
ЛС-002439

Перед использованием внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению



ISSN 1726-9784

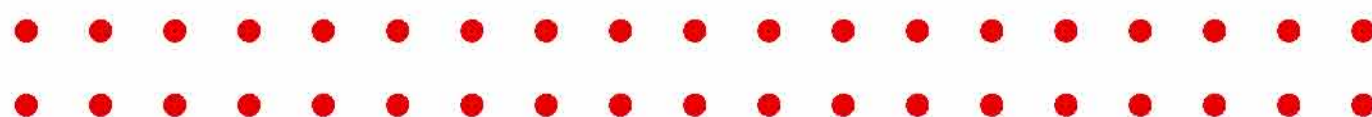
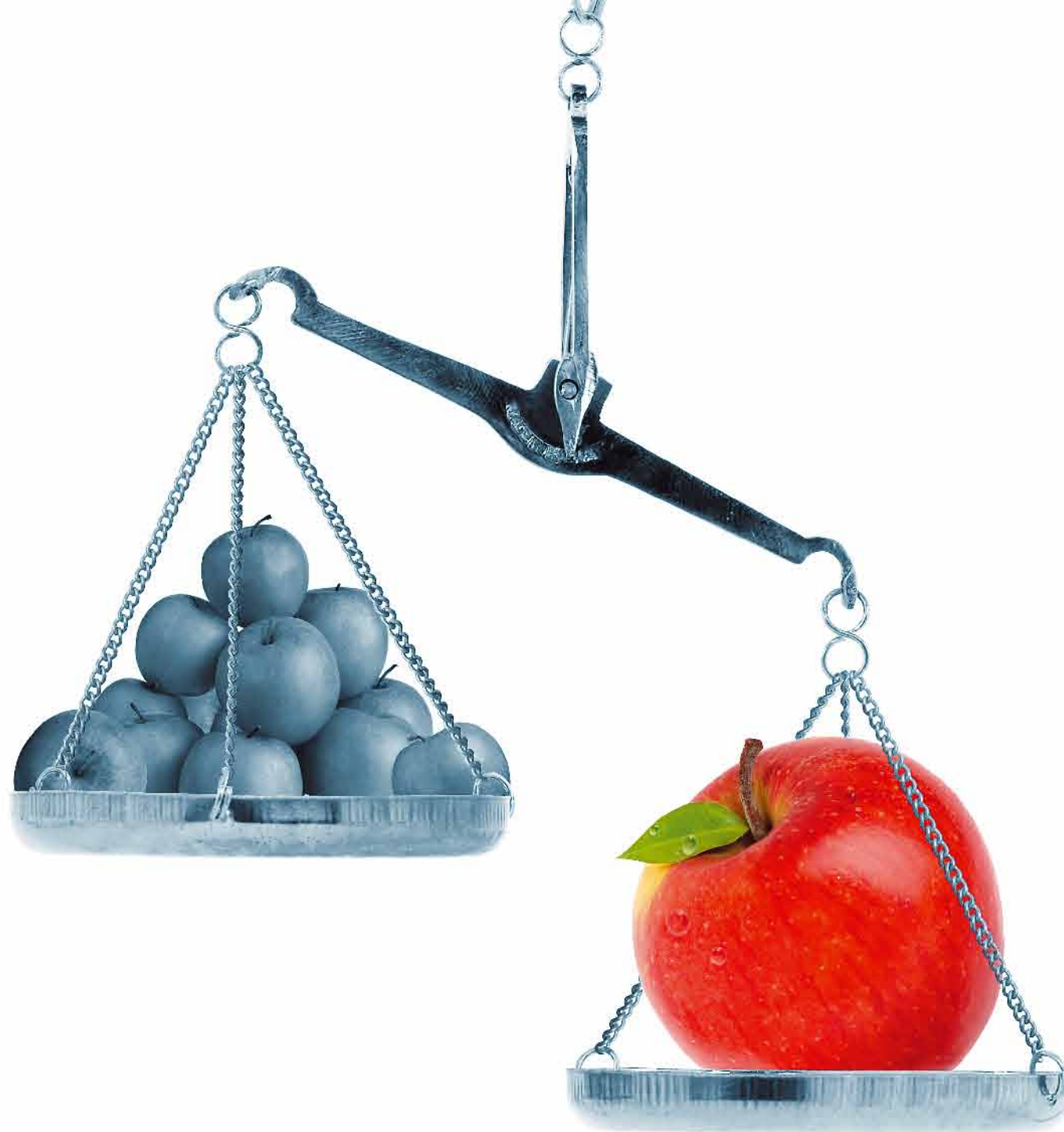
Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal
of Biotherapy

4/2010



- Эффективность и безопасность биоаналогов не очевидны, отсутствуют собственные рандомизированные клинические исследования (РКИ)¹.
- Регистрация биоаналога на основании декларированного сходства не является гарантией клинической безопасности и эффективности, сопоставимой с ЭПРЕКСом¹.



Будь уверен. Проверен.

По всем вопросам, связанным с применением препарата, обращаться в представительство "Инсели Фармацевтика Н.В." по адресу: 121614, Москва, ул. Крылатская, д.17, корпус 3. Факс 8 (495) 756-88-68, тел. 8 (495) 756-88-57 или позвонить на бесплатный номер для России и стран СНГ 8-800-700-88-10

П №018583/01
ЛС-002439

ЭС-ЕВ/Ер-Отеа/2009/JAN/15/01

Перед назначением внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению

Зофран[®]

ондансетрон

ДОБИВАЯСЬ БЕЗОГОВОРЧНОГО ШТИЛЯ

- КОНТРОЛИРУЯ** симптомы тошноты и рвоты столько, сколько потребуется
- ВЫБИРАЯ** удобную схему для профилактики и терапии тошноты и рвоты, вызванной химиотерапией
- ОПИРАЯСЬ** на максимальный мировой опыт антиэметической терапии



За дополнительной информацией обращайтесь в компанию ЗАО «ГлаксоСмитКляйн Трейдинг» по адресу: Россия, 121614, Москва, ул. Крылатская, 17 (бизнес-парк «Крылатские Холмы»), корп. 3, 5-й этаж. Тел. (495) 777 89 00, факс (495) 777 89 01

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№4 Том 9 2010 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, канд. фарм. наук, проф. (Москва),

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. (Нижегород),

Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.В. Степанова, д-р мед. наук (Москва),

Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.Г. Турнянская, канд. мед. наук (Москва),

С.А. Тюлядин, д-р мед. наук, проф. (Москва), Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук, проф. (Москва),

И.Ж. Шубина, канд. биол. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

Редакционный совет

Н.П. Бочков, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва), А.М. Гарин, д-р мед. наук, проф. (Москва),

Г.П. Георгиев, академик РАН, д-р биол. наук, проф. (Москва),

М.Л. Гершанович, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург),

М.И. Давыдов, академик РАН и РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),

М.Р. Личиницер, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф. (Москва),

В.А. Тутельян, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),

В.И. Чиссов, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва)

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

Регистрационный номер:

ПН №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 6,5 усл.-печ. листов,

подписано в печать 16.09.2010

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>Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р.</i> ИНГИБИТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ.	3
<i>Короленкова Л.И., Степанова Е.В., Барышников А.Ю.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА КАК ФАКТОРЫ ПРОГРЕССИИ ПЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ	11
<i>Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бибилашвили Р.Ш.</i> РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ АНТИГЕНЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ВАКЦИНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ.	17
<i>Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Личиницер М.Р.</i> ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ NFκB В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	27
<i>Зинченко С.В., Рудык А.Н., Хасанов Р.Ш.</i> ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАЗАМИ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ РАКА И АДЕНОКАРЦИНОМЫ БЕЗ ВЫЯВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА	31
<i>Якушева Т.А., Когония Л.М., Федотов А.Ю., Гришина И.М., Северцев А.Н., Байрамов Э.Т.</i> АВАСТИН В ЛЕЧЕНИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА	35
<i>В.И. Масычева, А.О. Белкина, Е.Д. Даниленко, Г.М. Сысоева</i> НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПРЕПАРАТОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ	39

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Мудунов А.М.</i> ВЫБОР ТАКТИКИ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С САРКОМАМИ ОСНОВАНИЯ ЧЕРЕПА: ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	45
<i>А.Т. Амирасланов¹, Х.К. Мурадов², А.Г. Велчева¹</i> ВЛИЯНИЕ ЭНДОКРИННО-КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА НА ТЕЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ ГОРМОНПРОДУЦИРУЮЩЕГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	51
<i>И.Н. Михайлова, К.Д. Никитин, Н.Н. Петенко, К.А. Парсункова, И.А. Утяшев, М.А. Рубцова, Г.З. Чкадуа, К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников</i> МЕТОД ELISPOT ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, НАГРУЖЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫМ ЛИЗАТОМ	55
<i>Н.И. Гринева, Т.В. Ахлынина, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Т.Г. Сарычева, Д.А. Шмаров, А.М. Тимофеев, Н.М. Найденкова, Г.П. Саркисян, Т.В. Боровкова, А.Р. Гавричкова, Л.Ю. Кодосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, С.В. Кузнецов, О.Ю. Виноградова, Е.Ю. Чельшева, А.Г. Туркина</i> РАЗЛИЧИЯ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ РН КЛЕТОК ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ХМЛ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ: 3 РН КЛЕТКИ С ЧЕРЕДОВАНИЕМ ЭТАПОВ ЭФФЕКТИВНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЭФФЕКТИВНОГО СОЗРЕВАНИЯ	61
<i>Г.П. Генс¹, Н.И. Моисеева², Т.П. Стромская², Е.Ю. Рыбалкина², А.В. Вайман², Л.П. Овчинников², А.А. Ставрова</i> ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКА УВ-1 И ХИМИОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	77
<i>Е.С. Герштейн, А.М. Щербаков, А.М. Платова, Г.Ю. Чемерис, А.А. Тулеуова, З.К. Карабекова, И.В. Терешкина, Л.К. Овчинникова, М.В. Грицкевич, В.П. Летагин</i> СОДЕРЖАНИЕ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB В ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	85
<i>А.И. Катунина, Е.С. Герштейн, В.Д. Ермилова, И.В. Терешкина, А.Ю. Назаренко, А.А. Тулеуова, О.В. Кузнецова, З.К. Карабекова, М.В. Грицкевич, Е.К. Дворова, Т.Т. Березов</i> СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 2; 7 И 9 В ОПУХОЛЯХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	89
<i>А.В. Караулов¹, Н.Ю. Анисимова², Ю.И. Должикова², С.И. Сокурено^{1,3}, В.Ф. Ликов¹, Т.В. Борисова¹, М.В. Киселевский</i> СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ	93
<i>И.Н. Григорьева, О.С. Бурова, Е.В. Степанова, Т.К. Харатишвили, А.Ю. Барышников</i> СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ К ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ	97
<i>Н.В. Голубцова¹, И.Н. Михайлова¹, В.В. Новиков², К.А. Парсункова¹, И.В. Самойленко¹, Н.Н. Петенко¹, Е.В. Огородникова², В.Н. Тазаев¹, Е.А. Черемушкин¹, К.А. Барышников¹, Е.В. Коржеевская¹, Н.Б. Преснякова², Г.З. Чкадуа¹, Л.В. Демидов¹, А.Ю. Барышников¹</i> ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ УРОВНЕЙ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ HLA I КЛАССА И АНТИГЕНА CD8 У БОЛЬНЫХ ДИСSEМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ	103
<i>Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИ-HIS ДОМЕНОВ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЧИСТКИ ИНТЕРФЕРОНА-α-2b ЧЕЛОВЕКА	107
<i>Н.Ю. Анисимова¹, В.А. Даванков², М.И. Будник¹, Т.С. Спирина², М.В. Киселевский¹</i> НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИСТИРОЛА, СПОСОБНЫЕ ЭЛИМИНИРОВАТЬ МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ КРОВИ	113
<i>Л.Н. Пылев, Л.А. Васильева, О.В. Смирнова</i> ТОРМОЗЯЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА «ГАЛАВИТ™» НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМОЙ МЕЗОТЕЛИОМЫ ПЛЕВРЫ У КРЫС WISTAR	115
<i>А.Ф. Лазарев¹, В.В. Климачев², В.Т. Зорькин², И.П. Бобров², А.М. Авдалян¹</i> ОСОБЕННОСТИ МАРКЕРОВ KI-67, PCNA, P53 И АКТИВНОСТИ НЕОАНГИОГЕНЕЗА В ПРОГНОЗЕ РАКА ЖЕЛУДКА	117
<i>О.И. Каганов¹, Н.Е. Торопова², С.В. Козлов¹</i> КОНТРОЛЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫПОЛНЕНИЯ РАДИОЧАСТОТНОЙ АБЛАЦИИ КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ МЕТАСТАЗОВ ПЕЧЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОНКОМАРКЕРОВ	123
<i>А.Г. Барышев</i> НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА 1. Клинико-иммунологические особенности кардиоэзофагеального рака..... 2. Метастатического рака желудка.....	127 130

Список сокращений.....	133
Содержание журналов за 2010 год.....	134
Правила оформления статей.....	139
Разное.....	16; 76

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006-085.277.3:616.13/16:615.322

*Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р.***ИНГИБИТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ:
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Соломко Элисо Шаликовна, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-10-65;**e-mail:** e_stepanova@nm.ru

Статья поступила: 16.09.2010, принята к печати 03.11.2010.

Резюме

В настоящее время большое внимание исследователей привлекает проблема поиска новых антиангиогенных препаратов растительного происхождения. Программы скрининга существуют в США, Южной Америке, Китае и других странах. В обзоре обобщены данные о наиболее перспективных веществах, выделенных из растений и обладающих антиангиогенными свойствами.

Ключевые слова: ингибиторы ангиогенеза, противоопухолевая терапия, вещества растительного происхождения, полифенолы.

*E.Sh. Solomko, E.V. Stepanova, M.E. Abramov, A.Yu. Baryshnikov, M.R. Lichinitser***ANGIOGENESIS INHIBITORS FROM PLANTS ORIGIN:
PERSPECTIVE FOR CLINICAL USAGE***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

At present, screening for agents derived from plants that inhibit tumor angiogenesis becomes one of the promising approaches to treat tumor. The program of plant' anti-angiogenic activity screening exists in USA, South America and other countries. In this review we discuss the data accumulated of plant origin' agents with high anti-angiogenic activity.

Key words: angiogenesis inhibitors, antitumor therapy, agents derived from plants, polyphenols.

Введение

В течение последних 50 лет был создан определенный арсенал эффективных противоопухолевых препаратов [91; 11], что позволило достигнуть значительных успехов в лечении злокачественных опухолей человека [40]. Однако большинство новообразований являются/становятся резистентными к проводимой противопухолевой химиотерапии [23; 91], ограничивая эффективность лечения [91; 11]. Требуется разработка новых современных высокоэффективных противоопухолевых препаратов.

Одной из причин редкого появления новых противоопухолевых препаратов в онкологической практике и их высокой стоимости называется несбалансированность показателя «цена – успех» традиционной методологии поиска и усовершенствования новых лекарств. В настоящее время основной методологией является проведение химического синтеза большого количества химически подобных веществ и скрининга высокой плотности [31]. Используя комбинаторный химический подход, синтезируется большое количество структурно связанных веществ [19; 34], которые затем исследуются на противоопухолевую биологическую активность с помощью скрининга высокой плотности. С

помощью данного подхода были синтезированы и исследованы многочисленные библиотеки потенциально биоактивных пептидов, олигонуклеотидов и небольших органических молекул [61].

Однако результаты, полученные с помощью данной методологии, часто не оправдывают всех ожиданий. Большинство полученных пептидов и олигонуклеотидов не имеют полезных фармакологических свойств, тогда как химическое разнообразие органических соединений, которые по физико-химическим свойствам пригодны для создания лекарств, было меньше, чем ожидалось [61].

В последнее время возрос интерес к другому часто используемому подходу – скринингу веществ природного происхождения [16; 31], преимущество которого в том, что вещества-кандидаты уже обладают некоторыми свойствами, необходимыми для лекарств (например, абсорбцией в желудочно-кишечном тракте и метаболизмом), а также высоким химическим разнообразием, необходимым для изучения корреляций активность–структура [31]. Выделенные из природных источников вещества могут быть использованы в скрининге высокой плотности, и лидерное соединение может быть оптимизировано с помощью методов комбинаторной химии или других подходов современной клинической химии [15].

Однако стратегия создания новых противоопухолевых препаратов, основанная на использовании веществ растительного происхождения, имеет ряд сложностей, которые не возникают при использовании методов рационального синтеза, которые связаны с получением полной коллекции растений, произрастающих на определенной территории, трудностями изоляции и получения фармакологически активных веществ и правами на интеллектуальную собственность. Даже с учетом всех сложностей, скрининг природных веществ может быть более эффективен, чем таковой рационально созданных соединений.

В настоящее время во многих странах – США, Южной Америке, Китае и других – имеются программы, направленные на разработку противоопухолевых препаратов на основе веществ, полученных из природных источников [54; 56; 62].

Вещества природного происхождения как противоопухолевые препараты

Соединения, впервые полученные из растений, активно используются в современной онкологии (табл. 1). Все из них были впервые обнаружены при изучении противоопухолевых свойств различных фракций, выделенных из растений, затем, в большинстве случаев, путем химической модификации исходного активного вещества получены его полусинтетические высокоэффективные аналоги.

Винкаалкалоиды – структурно родственные вещества, в химической структуре которых присутствуют две полициклические единицы – виндолин и катарантин. К винкаалкалоидам относятся винбластин и винкристин – алкалоиды, выделенные из растения барвинка розовый (*Vinca rosea* L.), а также виндезин и винорельбин – полусинтетические производные винбластина. Винорельбин отличается по структуре от других алкалоидов барвинка наличием 8-членного кольца катарантина (вместо 9-членного). Противоопухолевое действие этих алкалоидов обусловлено влиянием на клетки в М-фазе клеточного цикла. Использование винкаалкалоидов впервые позволило достигнуть высокого эффекта в лечении ряда злокачественных заболеваний – саркомы Капоши, меланомы, рака носоглотки, рака молочной железы, почки, мочевого пузыря и других [1; 18].

К противоопухолевым средствам растительного происхождения также относят подофиллин (смесь природных веществ, выделяемая из корневищ подофилла щитовидного (*Podophyllum peltatum* L.) семейства барбарисовых (*Berberidaceae*)). Подофиллин содержит не менее 40 % подофиллотоксина, α - и β -пельтатины. В клинической практике широко используются полусинтетические производные подофиллотоксина – **эпиподофиллотоксины** (этопозид и тенипозид), относящиеся по механизму действия к ингибиторам топоизомеразы II. Комбинации с использованием этопозидов в настоящее время широко используются для лечения рака яичка, мочевого пузыря, мелкоклеточного рака легкого, гематосаркомы, нейробластомы и медуллобластомы [1].

Разработанные в 1990-х гг. **таксаны** произвели настоящую революцию, позволившую достигнуть значительных результатов в лечении солидных опухолей. Паклитаксел – первое производное таксана с противоопухолевой активностью, был выделен в 1967 г. из коры тиса тихоокеанского (*Taxus brevifolia*), в 1971 г. была расшифрована его химическая структура (является дитерпеноидным таксаном). В настоящее время паклитаксел получают также полусинтетическим и синтетическим путем. Доцетаксел, близкий к паклитакселу по структуре и механизму действия,

получают путем химического синтеза из природного сырья – иглы тиса европейского (*Taxus baccata*). Таксаны относятся к классу препаратов, действующих на микротрубочки. Они одобрены для лечения больных раком яичников, молочной железы, немелкоклеточного рака легких и опухолей головы и шеи [1; 29].

Полусинтетические производные алкалоида **камптотецина**, выделенного из стеблей кустарника *Camptotheca acuminata*, представлены Иринотеканом и Топотеканом. В соответствии с механизмом действия они относятся к группе ингибиторов топоизомеразы I. Иринотекан и топотекан одобрены для лечения больных колоректальным раком и как 2 линия химиотерапии для больных раком яичников [1]. Эти препараты также активны против других солидных злокачественных новообразований, таких как рак толстой кишки, легких, шейки матки и яичников [1; 30].

Поиск природных веществ, обладающих противоопухолевым действием, продолжается и в настоящее время. Некоторые перспективные препараты находятся в клинических испытаниях.

Среди них флавопиридол – синтетический флавоноид, полученный из растительного алкалоида рохитукина (*rohitukine*), выделенного из листьев и стеблей *Amoora rohituka* и позже из *Dysoxylum binectariferum* (*Maliaceae*) [1]. Он является одним из наиболее многообещающих соединений, выделенным из растений. Механизмы действия флавопиридола связывают с фосфорилированием циклин-зависимых киназ, которые блокируют клеточную пролиферацию в фазах G₁ и G₂, и индукцией апоптоза путем повышения содержания белка E2F1 и инактивации белка Mcl-1. [1]. В первой фазе клинических исследований флавопиридол [1] проявил дозозамещающую токсичность и показал высокую эффективность при лечении различных солидных и гематологических новообразований. Эти результаты позволили начать II фазу клинических испытаний у больных колоректальным раком, раком простаты, немелкоклеточным раком легких, почки, неходжкинскими лимфомами и хроническим лимфолейкозом.

Синтетическое соединение росковитин (*roscovitine*), полученное из природного вещества оломуцина (*olomucine*), выделенного из дайкона *Raphanus sativus* L. (*Brassicaceae*), в настоящее время также проходит II фазу клинических испытаний в Европе [14; 58]. Этот препарат также является ингибитором циклин-зависимых киназ.

Вещества природного происхождения как ингибиторы опухолевого ангиогенеза

Вещества, которые мы получаем с пищей, могут влиять на ангиогенную активность различных типов клеток организма. В ряде случаев, это влияние косвенное через различные патофизиологические изменения организма. Так, соблюдение определенной диеты приводит к снижению количества холестерина в крови, что может снижать синтез VEGF в различных (макрофагах, гладкомышечных клетках и других) клетках [37; 38; 73]. Длительные изменения в составе липидов крови, которые являются результатом неправильной диеты, могут влиять на ангиогенез и быть частью патогенеза кардиоваскулярной болезни у больного. Возможность использования составляющих пищи для успешного модулирования ангиогенеза человека еще до конца не доказана, хотя экспериментальные данные свидетельствуют, что это возможно. Существует множество съедобных растений, которые с давних времен используются человеком для предотвращения и/или лечения онкологических заболеваний. Однако их эффективность в большинстве случаев не доказана и часто очень сложна для оценки, поэтому их использование в онкологии должно обсуждаться с некоторым скептицизмом [14].

Так исследования показывают, что регулярное употребление некоторых фруктов и овощей может снизить статистический риск возникновения определенных типов опухолей [14]. Эффект данных растений связан с определенными соединениями, которые находят в них. Среди них наиболее активными являются ресвератрол, катехины, генистеин, куркумин. Активно изучают и другие вещества, такие как диаллил сульфид, S-аллил цистеин, аллицин, ликопен, капсаицин, 6-джинджерол, эллаговая кислота, урсоловая кислота, силимарин, анетол и евгенол [3; 20]. Они, как показано в исследованиях *in vivo* и *in vitro*, блокируют пролиферацию клеток, ингибируют сигнальные пути ростовых факторов, индуцируют апоптоз [20].

Считается, что первое антиангиогенное вещество растительного происхождения было выделено в 1990 г. Ингбером и соавторами, которые сообщили об антиангиогенных свойствах фумагилина, секретируемого антибиотика гриба *Aspergillus fumigatus* [36].

Различные про- и антиангиогенные вещества растительного происхождения с недавнего времени тестируются для потенциального клинического использования [21]. В табл. 2 приведены соединения,

изолированные из различных растений и обладающие антиангиогенной активностью. Однако стоит помнить, что у большей части описанных веществ активность подтверждена только в предварительных исследованиях *in vitro* и требуется больше данных для подтверждения перспектив их использования в клинической практике. Необходима тщательная и аккуратная характеристика активных химических соединений, определение молекулярных механизмов их действия, оценки в исследованиях *in vivo* на адекватных моделях болезней человека и, наконец, доказательства их безопасности и эффективности в клинических исследованиях [21; 68].

В настоящее время признано, что полифенолы являются самой активно изучаемой группой соединений для профилактики и лечения различных болезней человека. Среди них первое место занимают **флавоноиды**.

Флавоноиды принадлежат к группе природных веществ с разнообразной фенольной структурой. Идентифицировано более 4 000 видов флавоноидов, из которых более 500 находятся в свободном состоянии (негликозилированы). Это низкомолекулярные соединения, имеющие 3 бензольных кольца с различными заместителями.

Таблица 1

Противоопухолевые препараты, полученные из растительных источников

Препарат	Механизм действия	Растение-источник
Винбластин, Винкристин	Ингибирование полимеризации тубулина	<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)
Этопозид, Тенипозид	Ингибирование топоизомеразы II	<i>Podophyllum peltatum</i> , <i>P. emodi</i> (Berberidaceae)
Паклитаксел, Доцетаксел	Индукция стабилизации тубулина	<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)
Иринотекан, Топотекан	Ингибирование топоизомеразы I	<i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)

Выделяют несколько субклассов флавоноидов:

- антоцианиды, выделяемые из ягод и винограда,
- флаванолы – из чая,
- флавононы – из цитрусов,
- флавоны – из различных растений и перца,
- изофлавоны – из сои.

Наибольший интерес представляют флавоны и катехины [76].

Важным эффектом флавоноидов является ингибирование свободных форм радикалов. Эксперименты *in vitro* показали, что флавоноиды обладают противовоспалительным, антиаллергическим, противовирусными, и антиканцерогенными свойствами. Противовоспалительные и антиоксидантные свойства флавоноидов являются основными механизмами их антиангиогенного действия.

Ресвератрол был впервые выделен в 1940 году как составная часть корней чемерицы белой (*Veratrum grandiflorum*), в дальнейшем был также обнаружен в различных растениях, включая виноград, ягоды и арахис. Кроме кардиопротекторного эффекта проявляет и противоопухолевые свойства, блокируя рост лимфоидных и миелоидных опухолей, рака молочной железы, простаты, пищевода, толстой кишки, поджелудочной и щитовидной железы, меланомы и многих других [3]. Молекулярный механизм ингибирования пролиферации опухолевых клеток изучен только частично. Показано, что вовлечено блокирование некоторых транскрипционных факторов, таких как NFκB, AP-1 и Egr-1, снижение экспрессии антиапоптотических генов и активация каспаз [3; 71].

В отношении ангиогенеза ресвератрол снижает экспрессию некоторых ангиогенных цитокинов, включая VEGF и интерлейкин-8 [10].

Защитное влияние ресвератрола на ЭК часто инактивацией АФК [35]. АФК, такие как перекись водорода, полагают, играют важную роль в механизмах опухолевого ангиогенеза [57], запуская экспрессию ангиогенных стимуляторов, среди которых и VEGF [27; 80].

В исследованиях показано, что клеточной линии ЭК пупочного канатика человека HUVEC с ресвератролом (от 1 до 2,5 μM) значительно блокирует VEGF-зависимую миграцию клеток и формирование трубочко-подобных структур, но не пролиферацию. Ресвератрол эффективно блокирует VEGF-зависимую тирозинкиназную активность VE-кадгерина и при его связывании с β-катенином [53]. *In vivo* ресвератрол, вводимый вместе с питьевой водой, блокирует ангиогенез в модели стимуляции ангиогенеза глаза мыши [9].

Эффект связан с блокированием как VEGF, так и bFGF-рецептор-лигандного ответа с вовлечением фосфорилирования MAP киназы.

Показано, что ресвератрол может ингибировать опухолевый рост *in vivo* путем ингибирования ангиогенеза [9]. Введение ресвератрола *per os* ингибирует рост фибросаркомы мыши и значительно снижает заживление раны, процесса также зависящего от ангиогенеза [9].

Ресвератрол в дозе 40 мг/кг/день супрессирует ангиогенез и рост глиомы *in vivo* [85]. Эффект связан с проапоптотическим действием вещества на опухолевые клетки и снижением синтеза VEGF.

По другим данным, куркумин полностью предотвращает индукцию синтеза VEGF микроваскулярными ЭК, стимулированную с конечными продуктами гликолиза [65]. Куркумин влияет на ангиогенез в зависимости от других ростовых факторов. Недавно показано, что куркумин и его производные значительно ингибируют bFGF-зависимую неоваскуляризацию глаза мыши [6]. Однако он не оказывал эффект на продукцию VEGF, стимулированную форбол эстером [6]. Также куркумин блокирует синтез некоторых матричных металлопротеиназ, в частности MMP-9 и аминипептидазу N [83]. На моделях *in vivo* было показано, что куркумин ингибирует прогрессию химически индуцированного рака толстой кишки и кожи [6]. Куркумин также ингибирует рост меланомы B16 *in vivo*, как полагают, через ингибирование ангиогенеза и снижение синтеза NO и фактора некроза опухоли альфа [52].

Однако куркумин плохо адсорбируется из желудочно-кишечного тракта. В I фазе клинических исследований больные получали *per os* очень высокую дозу (до 1 гр.) куркумина, однако в сыворотке крови концентрация соединения определялась в наномолярных концентрациях [82]. Таким образом, эффективную дозу куркумина для осуществления фармакологической активности у человека достичь невозможно, его применение человека может быть ограничено местным применением.

Чай является одним из самых потребляемых напитков в мире. Ряд эпидемиологических исследований показывают: те люди, которые употребляют большое количество зеленого чая, имеют более низкий риск развития некоторых типов рака [41]. Основными действующими активными веществами зеленого чая являются катехины, в частности (–)-эпигаллокатехин галлат (EGCG), (–)-эпигаллоктахин (EGC), (–)-эпикатехин галлат (ECG) и (–)-эпикатехин (EC) [42]. EGCG является основным активным соединением. Он активирует апоптоз в опухолевых клетках, а также ингибирует опухолевую инвазию и ангиогенез.

Экспериментальные исследования показывают, что потребление зеленого чая мышами значительно снижает ангиогенез [41]. Механизмом антиангиогенного действия является ингибирование пролиферации ЭК в ответ на стимуляцию ангиогенными ростовыми факторами [47]. Данные эффекты достигаются блокированием рецепторов к VEGF, фосфорилированием VE-кадгерина и Akt, активацией некоторых транскрипционных факторов, таких как AP-1, NFkB и Ets-1 [49; 67; 84]. Также EGCG блокирует синтез металлопротеиназ, необходимых для миграции ЭК и инвазии опухолевых клеток [47; 49]. Он также блокирует синтез VEGF, bFGF, и ИЛ-8 [77; 78].

Однако II фаза клинических исследований у больных раком простаты не показало увеличение эффективности лечения [39]. Из 42 больных, кто получал большое количество зеленого чая, простатаспецифический антиген снизился только у одного больного. Проводятся дополнительные исследования эффективности катехинов зеленого чая [26].

Для клинического использования в США одобрена мазь Полифенон Е (Polyphenon E, Verregon, 15 %ная мазь Bradley/MediGene). Мазь является определенной смесью полифенольных катехинов, экстрагированных из листьев зеленого чая.

Показан для местного действия при доброкачественных опухолях половой системы.

Комбретастатины были выделены из коры южно-африканского дерева *Combretum caffrum* (Eckl. & Zeyh) Kuntze (Combretaceae) [69]. Комбретастатины – производные стильбенов, которые обладают антивазкулярными свойствами (разрушают вновь образо-

ванные сосуды), что приводит к некрозу опухоли [69; 71]. Они ингибируют полимеризацию тубулина [42]. Комбретастатин А-4 является эффективным против рака толстой кишки, легких и лейкозов. Исследования показывают, что он является многообещающим противоопухолевым антиангиогенным фитопрепаратом, выделенным в последнее время [22; 32; 64; 70; 74].

Особенности скрининга веществ растительного происхождения на антиангиогенную активность

Успехи в молекулярной биологии рака позволили создать новые подходы к противоопухолевой терапии больных, основанные на блокировании определенных механизмов роста и прогрессии опухолей. Поиск препаратов направленного действия требует усовершенствования специализированной методологии проведения скрининга. Требуется поиск не только цитотоксических веществ, но и ингибиторов ангиогенеза и метастазирования [17], активаторов иммунной системы [25], антагонистов митогенных сигналов роста клеток [43], блокаторов клеточного цикла [12; 92].

Не только отдельные активные соединения, но также активные фракции (экстракты) или валидированные и улучшенные рецепторные составы из нескольких растений, могут исследоваться для изучения их противоопухолевых и антиангиогенных свойств. Должен проводиться строгий анализ при переходе от фольклорного к основному международному использованию, который включает контроль состава, качества, безопасности и эффективности. Должны быть гарантированы высокое качество, постоянство от лота к лоту и эффективность/безопасность каждого этапа в создании стандартизированного нового препарата (одиночного или многокомпонентного) растительного происхождения в соответствии с контролем качества измерений GAP, GMP и GCP, [51].

Во многих лабораториях поиск ведется методом биоактивности – прямое фракционирование – изоляция BDF1 с последующим циклическим процессом оптимизации препарата. Он включает разработку дизайна, синтез, скрининг и анализ улучшенных аналогов с использованием взаимосвязи структура-активность, изучение механизмов действия, метаболизма препарата, молекулярного моделирования и параллельного исследовательского синтеза, а также проведение исследований по введению препарата, распределению, метаболизму, выведению и токсикологии ADMET и клинические испытания [50; 51].

Для скрининга природных веществ с антиангиогенными свойствами используются различные методы [2; 48; 59; 86].

In vitro тесты являются быстрыми методами для первичного скрининга большого количества соединений. Были разработаны методы оценки ангиогенной и антиангиогенной активности различных типов веществ *in vitro* с учетом основных этапов формирования новых кровеносных сосудов. Каждый из этих этапов: разрыв базальной мембраны, миграция, пролиферация и формирование трубочки – может являться мишенью для воздействия и может быть протестирован *in vitro*. Эти методы (пролиферации, миграции и формирования трубочек) могут быть использованы для идентификации ангиогенных факторов роста и прямых ингибиторов ангиогенеза. Например, антиангиогенная активность может быть оценена путем потенциала вещества ингибировать миграцию ЭК через камеру Бойдена. *In vitro* тесты сравнительно не дороги и дают более быстрый результат. Однако способность ингибировать пролиферацию ЭК, миграцию и формирование трубочко-подобных структур *in vitro* может не предсказывать эффект *in vivo*.

Таблица 2

Биоактивные растительные вещества и их эффект на ангиогенез

Общее название	Химическое название	Источник	Активность	Ссылка
Ресвератрол	3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene	Виноград	Ингибирование синтеза АФК и АФК-зависимое блокирование ангиогенеза (пролиферации ЭК, синтеза VEGF, bFGF, IIL-8)	Lin MT, 2003; Brakenhielm E, 2001 [9; 53]
Куркумин	diferuloylmethane	<i>Curcuma longa</i>	Ингибирование VEGF, Ang1 и Ang2 Ингибирование VEGF и bFGF-зависимого ангиогенеза	Gururaj AE, 2002 [28] Arbiser JL, 1998 [6]
Катехины чая	(-)-epigallocatechin gallate, (-)-epigallocatechin 3,5-di O-gallate, epitheaflagallin 3-O gallate	<i>Camellia sinensis</i>	Ингибирование MT1-MMP и формирования активной MMP-2 Блокирование VE-кадгерина и фосфорилирования Akt Ингибирование VEGF рецепторов на ЭК Снижение активности c-fos, c-jun и Ets-1	Yamakawa S, 2004; Fassina G, 2004 [24; 90] Tang FY, 2003 [84] Kojima-Yuasa A, 2003 [47] Lai HC, 2004 [49]
Флавоон	Родственные соединения флавоноидов	Различные растения	Ингибирование Rb, фосфорилирования Cdk2 и Cdk4 Ингибирование пролиферации ЭК	Arakaki N, 2004 [5]
Лютеолин	Tetrahydroxyflavone	Петрушка, артишок, перец, оливковое масло, лимон, мята, шалфей, тимьян	Ингибирование PI3K и VEGF-индуцированной пролиферации ЭК	Bagli E, 2004 [7]
Генистейн	–	Семейство <i>Leguminosae</i> (включая соевые бобы)	Ингибирование тирозин-киназ Ингибирование VEGF и MMP-9	Radzikowski C, 2004 [72] Ravindranath MH, 2004 [75]
Апигенин	5,7,4'-trihydroxyflavone	Яблоки, фасоль, брокколи, вишня, виноград, лук, петрушка, помидоры, чай и вино	Ингибирование HIF-1 и синтеза VEGF	Osada M, 2004 [66]
Поницидин и оридонин	–	<i>Rabdosia rubescens</i>	Ингибирование Akt и MAPK киназ	Sartippour MR, 2005 [78]
Ginseng	Ginsenosides (triterpene dammarenes)	<i>Panax ginseng</i>	Ингибирование ангиогенеза (опухоль)	Sengupta S, 2004; Sato K, 1994 [79; 81]
Ginseng	Ginsenosides (triterpene dammarenes)	<i>Radix rubra</i>	Стимуляция ангиогенеза (заживление ран)	Sengupta S, 2004; Morisaki N, 1995 [60; 81]
Полисахаро-пептид PSP	?	Съедобные грибы <i>Cortolus versicolor</i>	Ингибирование опухолевого ангиогенеза, блокирование VEGF	Ho JC, 2004 [33]
Полиацетилен (травяной чай)	?	<i>Bidens pilosa</i>	Ингибирование пролиферации ЭК, повышение активности p27(Kip) и p21(Cip1)	Wu LW, 2004 [89]
Баикалеин, эпикатехин, бреберин и ацетозид	?	Травы, входящие в состав сборов китайской медицины (<i>Berberis paraspecta</i> , <i>Taxus chinensis</i> и <i>другие</i>)	Снижение активности MMP-1,-2,-9 Ингибирование АФК Блокирование пролиферации ЭК и ангиогенеза	Wartenberg M, 2003 [87] Wang S, 2004 [86]
Птерогинидин	?	<i>Alchornea grandulosa</i>	Блокирование образования трубчечно-подобных структур ЭК Снижение активности NFκB	Lopes FCM, 2009 [55]
Артесунат	?	Полусинтетическое оединение Артемизина из <i>Artemisia annua</i>	Ингибирование пролиферации ЭК Ингибирование VEGF рецептор-лигандной системы	Chen HH, 2004 [13]

Короткая или длительная инкубация гладкомышечных клеток сосудов с полифенольными соединениями красного вина ингибирует синтез VEGF и его высвобождение в ответ на действие тромбоцитарного фактора роста АВ (PDGF АВ), трансформирующего фактора β -1 (TGF- β 1) или тромбина [44; 63].

Подобный эффект оказывает ресвератрол, выделенный из других растений, например из корней *Polygonum cuspidatum*, предотвращая опухолевый рост карциномы Льюис мыши, метастазирование в легкие и ангиогенез [45; 46].

Куркумин – соединение небольшого молекулярного веса, выделенное из традиционно используемой специи куркумы. Куркумин снижает активность транскрипционного фактора NFkB, AP-1 и Egr-1, ингибирует экспрессию циклоксигеназы 2, активатора плазминогена урокиназного типа, фактора некроза опухоли альфа, хемикинов, молекул адгезии клеточной поверхности и циклина D1, ингибирует активность рецепторов факторов роста (например, эпидримального фактора роста 1 и 2 типа). Также он блокирует активность c-Jun киназы, других тирозинкиназ и серин/треониновых киназ [4; 88]. Блокирование NFkB и AP-1 куркумином снижает экспрессию ИЛ-8 в клетках рака молочной железы, но не влияет на синтез VEGF [8].

По другим данным, куркумин полностью предотвращает индукцию синтеза VEGF микроваскулярными ЭК, стимулированную с конечными продуктами гликолиза [65]. Куркумин влияет на ангиогенез в зависимости от других ростовых факторов. Недавно показано, что куркумин и его производные значительно ингибируют bFGF-зависимую неоваскуляризацию глаза мыши [6]. Однако он не оказывал эффект на продукцию VEGF, стимулированную фобол эстером [6]. Также куркумин блокирует синтез некоторых матриксных металлопротеиназ, в частности MMP-9 и аминипептидазу N [83]. На моделях *in vivo* было показано, что куркумин ингибирует прогрессию химически индуцированного рака толстой кишки и кожи [6]. Куркумин также ингибирует рост меланомы B16 *in vivo*, как полагают, через ингибирование ангиогенеза и снижение синтеза NO и фактора некроза опухоли альфа [52].

Однако куркумин плохо адсорбируется из желудочно-кишечного тракта. В I фазе клинических исследований больные получали *per os* очень высокую дозу (до 1 гр.) куркумина, однако в сыворотке крови концентрация соединения определялась в наномолярных концентрациях [82]. Таким образом, эффективную дозу куркумина для осуществления фармакологической активности у человека достичь невозможно, его применение человека может быть ограничено местным применением.

Чай является одним из самых потребляемых напитков в мире. Ряд эпидемиологических исследований показывают: те люди, которые употребляют большое количество зеленого чая, имеют более низкий риск развития некоторых типов рака [41]. Основными действующими активными веществами зеленого чая являются катехины, в частности (–)-эпигаллокатехин галлат (EGCG), (–)-эпигаллоктахин (EGC), (–)-эпикатехин галлат (ECG) и (–)-эпикатехин (EC) [42]. EGCG является основным активным соединением. Он активирует апоптоз в опухолевых клетках, а также ингибирует опухолевую инвазию и ангиогенез.

Экспериментальные исследования показывают, что потребление зеленого чая мышами значительно снижает ангиогенез [41]. Механизмом антиангиогенного действия является ингибиро-

вание пролиферации ЭК в ответ на стимуляцию ангиогенными ростовыми факторами [47]. Данные эффекты достигаются блокированием рецепторов к VEGF, фосфорилированием VE-кадгерина и Akt, активацией некоторых транскрипционных факторов, таких как AP-1, NFkB и Ets-1 [49; 67; 84]. Также EGCG блокирует синтез металлопротеиназ, необходимых для миграции ЭК и инвазии опухолевых клеток [47; 49]. Он также блокирует синтез VEGF, bFGF, и ИЛ-8 [77; 78].

Однако II фаза клинических исследований у больных раком простаты не показало увеличение эффективности лечения [39]. Из 42 больных, кто получал большое количество зеленого чая, простата-специфический антиген снизился только у одного больного. Проводятся дополнительные исследования эффективности катехинов зеленого чая [26].

Для клинического использования в США одобрена мазь Полифенон Е (Polyphenon E, Verregen, 15 %-ная мазь Bradley/MediGene). Мазь является определенной смесью полифенольных катехинов, экстрагированных из листьев зеленого чая. Показан для местного действия при доброкачественных опухолях половой системы.

Комбретастатины были выделены из коры южно-африканского дерева *Combretum caffrum* (Eckl. & Zeyh) Kuntze (Combretaceae) [69]. Комбретастатины – производные стильбенов, которые обладают антивазкулярными свойствами (разрушают вновь образованные сосуды), что приводит к некрозу опухоли [69; 71].

Они ингибируют полимеризацию тубулина [42]. Комбретастатин А-4 является эффективным против рака толстой кишки, легких и лейкозов. Исследования показывают, что он является многообещающим противоопухолевым антиангиогенным фитопрепаратом, выделенным в последнее время [22; 32; 64; 70; 74].

Особенности скрининга веществ растительного происхождения на антиангиогенную активность

Успехи в молекулярной биологии рака позволили создать новые подходы к противоопухолевой терапии больных, основанные на блокировании определенных механизмов роста и прогрессии опухолей. Поиск препаратов направленного действия требует усовершенствования специализированной методологии проведения скрининга.

Требуется поиск не только цитотоксических веществ, но и ингибиторов ангиогенеза и метастазирования [17], активаторов иммунной системы [25], антагонистов митогенных сигналов роста клеток [43], блокаторов клеточного цикла [12; 92].

Не только отдельные активные соединения, но также активные фракции (экстракты) или валидированные и улучшенные рецепторные составы из нескольких растений, могут исследоваться для изучения их противоопухолевых и антиангиогенных свойств.

Должен проводиться строгий анализ при переходе от фольклорного к основному международному использованию, который включает контроль состава, качества, безопасности и эффективности. Должны быть гарантированы высокое качество, постоянство от лота к лоту и эффективность/безопасность каждого этапа в создании стандартизированного нового препарата (одиночного или многокомпонентного) растительного происхождения в соответствии с контролем качества измерений GAP, GMP и GCP, [51].

Во многих лабораториях поиск ведется методом биоактивность – прямое фракционирование – изоляция BDFI с последующим циклическим процессом оптимизации препарата.

Он включает разработку дизайна, синтез, скрининг и анализ улучшенных аналогов с использованием взаимосвязи структура-активность, изучение механизмов действия, метаболизма препарата, молекулярного моделирования и параллельного исследовательского синтеза, а также проведение исследований по введению препарата, распределению, метаболизму, выведению и токсикологии ADMET и клинические испытания [50; 51].

Для скрининга природных веществ с антиангиогенными свойствами используются различные методы [2; 48; 59; 86].

In vitro тесты являются быстрыми методами для первичного скрининга большого количества соединений. Были разработаны методы оценки ангиогенной и антиангиогенной активности различных типов веществ *in vitro* с учетом основных этапов формирования новых кровеносных сосудов. Каждый из этих этапов: разрыв базальной мембраны, миграция, пролиферация и формирование трубочки – может являться мишенью для воздействия и может быть протестирован *in vitro*. Эти методы (пролиферации, миграции и формирования трубочек) могут быть использованы для идентификации ангиогенных факторов роста и прямых ингибиторов ангиогенеза.

Например, антиангиогенная активность может быть оценена путем потенциала вещества ингибировать миграцию ЭК через камеру Бойдена. *In vitro* тесты сравнительно не дороги и дают более быстрый результат. Однако способность ингибировать пролиферацию ЭК, миграцию и формирование трубочко-подобных структур *in vitro* может не предсказывать эффект *in vivo*.

Окончательные выводы об антиангиогенных свойствах вещества не могут быть сделаны только на основе анализа *in vitro*.

In vivo тесты являются более специфическими для детекции антиангиогенной активности. Методы анализа включают введение в глаз животным имплантата, индуцирующего ангиогенез, систему введения подкожно мышам имплантата Матригеля, оценка ангиогенеза на модели ксенографтов опухолей человека и мышей. Анализ *in vivo* обеспечивает более полную физиологическую оценку ангиогенеза, однако, более длительный и дорогой.

Степень антиангиогенной активности является дозозависимой. Большинство химиопрепаратов с антиангиогенными свойствами проявляют свою активность при введении в высоких дозах. В клинической практике особенно большой интерес вызывают соединения, которые проявляют свою активность при введении в низких дозах. Эти препараты имеют сравнительно низкую токсичность и могут иметь высокий терапевтический эффект.

Заключение

В настоящее время идут клинические исследования эффективности антиангиогенных препаратов, выделенных из растений. Тесная взаимосвязь между фундаментальными и клиническими исследованиями обеспечит создание новых высокоэффективных антиангиогенных препаратов из растений, произрастающих на территории Российской Федерации.

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (государственный контракт № 02.512.11.2195 от «12» мая 2008 г.).

Литература

1. Гарин А.М. и др. Справочник по противоопухолевой лекарственной терапии. – М.: «Ультра-Мед», 1992. – 200 с.
2. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Личиницер М.Р., Барышников А.Ю. Оценка антиангиогенной активности *in vitro*: опыт российского онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина/РБЖ. – 2007. – Т. 6, №3. – С. 3–7.
3. Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies//Anticancer Res. – 2004. – 24. – P. 2783–840.
4. Aggarwal B.B., Kumar A., Bharti A.C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies // Anticancer Res. – 2003. – 23. – P. 363–98.
5. Arakaki N., Toyofuku A., Emoto Y. et al. Induction of G1 cell cycle arrest in human umbilical vein endothelial cells by flavone's inhibition of the extracellular signal regulated kinase cascade // Biochem. Cell Biol. – 2004. – 82. – 583–8.
6. Arbiser J.L., Klauber N., Rohan R. et al. Curcumin is an *in vivo* inhibitor of angiogenesis//Mol. Med. – 1998. – 4. – P. 376–83.
7. Bagli E., Stefaniotou M., Morbidelli L. et al. Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity // Cancer Res. – 2004. – 64. – P. 7936–46.
8. Bobrovnikova-Marjon E.V., Marjon P.L., Barbash O. et al. Expression of angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 is highly responsive to ambient glutamine availability: role of nuclear factor-kappaB and activating protein-1 // Cancer Res. – 2004. – 64. – P. 4858–69.
9. Brakenhielm E., Cao R., Cao Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes // FASEB J. – 2001. – 15. – P. 1798–800.
10. Cao Y., Cao R., Brakenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols//J. Nutr. Biochem. – 2002. – 13. – P. 380–90.
11. Chabner B.A. Anti-cancer drugs. In: DeVita V.T.-Jr et al eds. Cancer: Principles and Practice, 4th ed., 1991. – P. 325–417.
12. Chang C.J., Ashendel C.L., Geahlen R.L. et al. Oncogene signal transduction inhibitors from medicinal plants // Anticancer Res. – 1995. – 15. – P. 1740–1.
13. Chen H.H., Zhou H.J., Wu G.D., Lou XE. Inhibitory effects of artesunate on angiogenesis and on expressions of vascular endothelial growth factor and VEGF receptor KDR/FLK-1 // Pharmacology. – 2004. – 7. – P. 1–9.
14. Cragg G.M., Newman D.J. Medicinals for the millennia: the historical record//Ann. N.-Y. Acad. Sci. – 2001. – 953. – P. 3–25.
15. Cragg G.M., Newman D.J. Plants as source of anticancer agents // J. Ethnopharmacol. – 2005. – 100. – P. 72–9.
16. Cragg G.M., Newmann D.J., Snader K.M. Natural products in drug discovery and development//Nat. Prod. – 1997. – 60. – P. 52–60.
17. Dark G.G., Hill S.A., Prise V.E. et al. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature // Cancer Res. – 1997. – 57. – P. 1829–34.
18. Dolle R.E., Nelson K.H. Jr. Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 1998//J Comb Chem. – 1999. – 4. – P. 235–82.
19. Dolle R.E. Comprehensive survey of chemical libraries yielding enzyme inhibitors, receptor agonists and antagonists, and other biologically active agents // Mol Divers. – 1997. – 2. – P. 223–36.
20. Dorai T., Aggarwal B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy//Cancer Lett. – 2004. – 215. – P. 129–40.
21. Dulak J. Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: Hopes and reality // Journal of physiology and pharmacology. – 2005. – 56, Suppl 1, 51.69.

22. Evans D. and Cozens R. Combination Effects Following Addition of the Tumour-Vascular Disrupting Agent ASA404 (Vadimezan) to Taxane-Containing Regimens of Trastuzumab and Bevacizumab in Human Breast Cancer Xenograft Models // *Cancer Res. Dec.* – 2009. – 69. – P. 3142.
23. *Fact sheet.* Twelve major cancers // *Scientific Am.* – 1996. – 275. – P. 92–8.
24. Fassina G., Vene R., Morini M. et al. Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate // *Clin Cancer Res.* – 2004. – 10. – P. 4865–73.
25. Gopalakrishna R., Chen Z., Yoolee K. et al. Chelerythrine and sanguinarine alkaloids induce membrane translocation and irreversible inactivation of protein kinase C by modifying thiol residues // *Proc Am Assoc Cancer Res.* – 1994. – 35. – A3666.
26. Greenwald P. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future // *J. Nutr.* 2004. – 134. – P. 3507–12.
27. Grzenkowicz-Wydra J., Cisowski J., Nakonieczna J. et al. Gene transfer of CuZn superoxide dismutase enhances the synthesis of vascular endothelial growth factor // *Mol Cell Biochem.* – 2004. – 264. – P. 169–81.
28. Gururaj A.E., Belakavadi M., Venkatesh D.A. et al. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – 297. – P. 934–42.
29. Harvey A.L., Bradley K.N., Cochran A.S. et al. What can toxins tell us for drug discovery? // *Toxicol.* – 1998. – 36. – P. 1635–40.
30. Harvey A.L. *Advances in Drug Discovery Techniques.* Chichester: John Wiley & Sons, 1998.
31. Harvey A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? // *Trends Pharmacol Sci.* – 1999. – 20. – P. 196–8.
32. Hida T., Takeda K., Daga H. et al. A safety and tolerability study of vadimezan in combination with docetaxel in Japanese patients with advanced or recurrent solid tumors // *J Clin Oncol.* – 2010. – 28. – 13106.
33. Ho J.C., Konerding M.A., Gaumann A. et al. Fungal polysaccharopeptide inhibits tumor...
34. Hogan J.C. Directed combinatorial chemistry // *Nature.* – 1996. – 384(suppl). – P. 17–9.
35. Igura K., Ohta T., Kuroda Y. et al. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro // *Cancer Lett.* – 2001. – 171. – P. 11–6.
36. Ingber D., Fujita T., Kishimoto S. et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth // *Nature.* – 1990. – 348. – P. 555–7.
37. Inoue M., Itoh H., Tanaka T. et al. Oxidized LDL regulates vascular endothelial growth factor expression in human macrophages and endothelial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma // *Arterioscler Thromb. Vasc Biol.* – 2001. – 21. – P. 560–6.
38. Inoue M., Itoh H., Ueda M. et al. Vascular endothelial growth factor... expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis // *Circulation.* – 1998. – 98. – P. 2108–16.
39. Jatoi A., Ellison N., Burch P.A. et al. A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma // *Cancer.* – 2003. – 97. – P. 1442–6.
40. Jessup J.M., McGinnis L.S., Winchester D.P. et al. Clinical highlights from the National Cancer Database: 1996. // *CA Cancer J Clin.* – 1996. – 46. – P. 185–7.
41. Jung Y.D., Ellis L.M. Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate ..., a major component of green tea // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2001. – 82. – P. 309–16.
42. Kanthou C., Tozer G.M. The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells // *Blood.* – 2002. – 99(6). – P. 2060–9.
43. Kensil C.R., Barrett C., Kushner N. et al. Development of a genetically engineered vaccine against feline leukemia virus infection // *J Am Vet Med Assoc.* – 1991. – 199. – P. 1423–7.
44. Kim J.H., Shim J.S., Lee S.K. et al. Microarray-based analysis of anti-angiogenic activity of demethoxycurcumin on human umbilical vein endothelial cells: ... down-regulation of matrix metalloproteinase // *Jpn. J. Canc. Res.* – 2002. – 93. – P. 1378–85.
45. Kimura Y., Okuda H. Effects of naturally occurring stilbene glucosides from medicinal plants and wine, on tumour growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice // *J Pharm Pharmacol.* – 2000. – 52. – P. 1287–95.
46. Kimura Y., Okuda H. Resveratrol isolated from Polygonum cuspidatum root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma bearing mice // *J Nutr.* – 2001. – 131. – 1844–9.
47. Kojima-Yuasa A., Hua J.J., Kennedy D.O. et al. Green tea extract inhibits angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells through reduction of expression of VEGF receptors // *Life Sci.* – 2003. – 73. – P. 1299–313.
48. Kruger E.A., Duray P.H. et al. Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents // *Semin. Oncol.* – 2001. – 28. – P. 570–6.
49. Lai H.C., Chao W.T., Chen Y.T. et al. Effect of EGCG, a major component of green tea, on the expression of Ets-1, c-Fos, and c-Jun during angiogenesis in vitro // *Cancer Lett.* – 2004. – 213. – 181–8.
50. Lee K.-H. Antitumor agents 231 and anti-AIDS agents 59. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads // *Journal of Natural Products.* – 2004. – 67. – P. 273–83.
51. Lee K.-H. Recent Advances in the Discovery and Development of Plant-derived Chemotherapeutic Agents // *International Journal of Applied Science and Engineering.* – 2005. – 3(3). – P. 151–5.
52. Leyon P.V., Kuttan G. Studies on the role of some synthetic curcuminoid derivatives in the inhibition of tumour specific angiogenesis // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2003. – 22. – P. 77–83.
53. Lin M.T., Yen M.L. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation // *Mol Pharmacol.* – 2003. – 64. – P. 1029–36.
54. Loboda A., Cisowski I.J., Zarębski A. et al. Effect of plant extracts on angiogenic activities of endothelial cells and keratinocytes // *Journal of physiology and pharmacology.* – 2005. – 56(Suppl 1). – P. 125–37.
55. Lopes F.C.M., Rocha A., Pirraco A. et al. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from Alchornea glandulosa // *BMC Complementary and Alternative Medicine.* – 2009. – 9. – P. 15–25.
56. Mans D.R.A., Da Rocha A.B., Schwartzmann G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds // *The Oncologist.* – 2000. – 5. – P. 185–98.
57. Maulik N. Redox signaling of angiogenesis // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – 4. – P. 805–15.
58. Meijer L., Raymond E. Roscovitine and other purines ... to clinical trials // *Accounts Chem Res.* – 2003. – 36. – P. 417–25.
59. Miller K.D. et al. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – 19. – P. 1195–206.
60. Morisaki N. et al. Mechanism of angiogenic effects of saponin from ginseng ... // *Br. J. Pharmacol.* – 1995. – 115. – P. 1188–93.
61. Nefzi A., Ostresh J.M., Houghten R.A. Combinatorial chemistry: from peptides... // *Chem Rev.* – 1997. – 97. – P. 449–72.
62. Normile D. Asian medicine. The new face of traditional Chinese medicine // *Science.* – 2003. – 299. – P. 188–90.

(окончание списка литературы см. на вклейке стр. VI)

УДК 618.146-006.6:616-091.818:578.28HIV:57.088

*Л.И. Короленкова, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников***МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА КАК ФАКТОРЫ ПРОГРЕССИИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ***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: 26.07.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Рак шейки матки является одной из наиболее часто встречающихся форм рака у женщин в мире. Канцерогенез РШМ протекает в течение 10–30 лет на фоне персистирующей ВПЧ-инфекции высокого онкогенного риска и проходит этапы CIN I, II и III степени. В настоящее время большое внимание уделяется скринингу CIN для профилактики возникновения цервикального рака. Проводятся многочисленные исследования для оценки специфичности окрашивания неопластических клеток при разных степенях CIN в тканях шейки матки и цитологических образцах. Большое значение для идентификации таких маркеров имеет изучение механизмов и сигнальных путей, участвующих в формировании и прогрессии внутриэпителиальных неоплазий до РШМ у женщин. В обзорной статье рассматриваются основные механизмы и мишени, вовлеченные в канцерогенез РШМ. Рассматриваются перспективные маркеры для диагностики CIN.

Ключевые слова: цервикальные интраэпителиальные неоплазии, дисплазии шейки матки, CIN, ВПЧ-инфекция, маркеры прогрессии CIN.

*L.I. Korolenkova, E.V. Stepanova, A.Yu. Baryshnikov***PROLIFERATION AND APOPTOSIS' BIOMARKERS OF AS FACTORS OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND CERVICAL CANCER DEVELOPMENT***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Cervical cancer is one of the most widespread cancers in female population. Cervical cancerogenesis progresses for 10–30 years and is induced by persisting HPV-infection. Cervical cancerogenesis passes through a number of cervical intraepithelial neoplasias grade I, II and III. Much attention is paid to CIN screening and cervical cancer prevention. At present diverse approaches are used to reveal the specificity of neoplastic cell at different stages of CIN in cervical biopsies or smears. To identification of these biomarkers depends greatly on our knowledge of signaling pathways driving CIN to cervical cancer. In this review we discuss the signaling pathways involved in cervical cancer cancerogenesis and progression. We also suggest some new possible biomarkers to diagnose CIN.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, HPV-infection, markers of CIN progression.

Введение

В мире одной из наиболее часто встречающихся форм рака у женщин является рак шейки матки. Главным иницирующим фактором канцерогенеза цервикального рака является персистирующая папилломовирусная инфекция высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР).

По данным информационного центра по изучению заболеваний, вызванных ВПЧ, в результате скрининга в 2008 г. в мире зарегистрировано 300 000 000 инфицированных ВПЧ высокого и низкого канцерогенного риска, более 50 000 000 больных CIN III с тяжелой дисплазией или преинвазивным раком, 493 000 случаев РШМ (10 % от всех случаев рака у женщин) и 274 000 летальных исходов от него [57].

Преинвазивные повреждения эпителия шейки матки – дисплазии или цервикальные интраэпителиальные неоплазии – особенно часто встречаются у женщин в возрасте от 25 до 40 лет. Возникновение CIN всегда связано с персистенцией ВПЧ-инфекции.

Выделяют три степени интраэпителиальных неоплазий шейки матки:

- слабую – CIN 1;
- умеренная – CIN;
- тяжелая дисплазия и карцинома *in situ* – CIN 3.

До инвазивного рака в течение 5–10 лет прогрессируют 20–50 % CIN 3 [29; 36; 53]. При организованном скрининге больные должны быть выявлены и получить лечение до развития инвазивного рака, на этапе CIN. Традиционный цитологический скрининг имеет невысокую чувствительность даже в отношении CIN 2–3 (55–74 %) [35; 43; 50], а при скрининге, основанном на ВПЧ-тестировании, выявляют большое количество женщин с транзитной ВПЧ-инфекцией, что отражает низкую специфичность такого подхода.

Оптимальное сочетание ВПЧ-тестирования с последующей цитологической выборкой все-таки не может выявить всех больных с CIN. После выявления CIN 1–2 необходимо выделить в данной группе больных с переходом продуктивной инфекции в трансформирующую, сопряженную с риском развития РШМ.

Улучшить качество диагностики и программ скрининга РШМ можно путем дополнения традиционных цитологических, гистологических и вирусологических исследований определением специфических маркеров неоплазии цервикального эпителия. В эпоху тотальной вакцинации против ВПЧ важность этих маркеров значительно повышается. Скрининговые программы по-прежнему будут необходимы в силу возрастающей опасности инфицирования новыми типами ВПЧ ВКР [19; 26; 41].

Выявление специфических маркеров по степени окрашивания неопластических клеток в тканях шейки матки проводят с помощью ИГХ биоптатов, а также цитологических образцов [8; 23; 38]. Несмотря на то, что в настоящее время известно несколько маркеров для диагностики CIN, прогнозирование течения, улучшение диагностики и лечение предраковых и раковых заболеваний шейки матки невозможно без новых специфических маркеров неопластического процесса. Большое значение для идентификации таких маркеров имеет изучение механизмов и сигнальных путей, участвующих в формировании и прогрессии CIN у женщин.

Признаки развития и прогрессии CIN Молекулярно-биологические маркеры пролиферации

В разных слоях эпителия происходит выделение белков ранних (*E2, E4, E5, E6, E7*) и поздних (*L1, L2*) генов ВПЧ, однако не всегда события жизненного цикла вируса являются упорядоченными. В зоне трансформации при формировании CIN 2–3 последовательная слоям эпителия экспрессия вирусных генов нарушается: экспрессия *E4* смещается к поверхностным слоям эпителия; в основной части клеток эпителия экспрессируются белки *E6* и *E7* и суррогатные их биомаркеры *MCM (E7), PCNA, Ki 67* и *P16*, белок *L1* может вообще не экспрессироваться. Суррогатные биомаркеры *E6* и *E7* постепенно выполняют все слои эпителия вплоть до поверхности с увеличением числа митозов в клетках. Вероятно, именно эта дисрегуляция экспрессии вирусных генов лежит в основе формирования тяжелых интраэпителиальных повреждений, а длительно существующая экспрессия белков ранних вирусных генов создает условия, в которых вторичные генетические сбои в геноме клетки хозяина не могут быть устранены. В результате нарастает нестабильность клеточного генома.

Вирусные белки *E6* и *E7* различными молекулярными механизмами способствуют ускорению прохождения инфицированными клетками клеточного цикла и ингибированию *p53*-зависимого апоптоза [49]. В итоге происходит неконтролируемое деление клеток и дисбаланс между пролиферацией и апоптозом, наблюдаемый при цервикальном канцерогенезе [61].

Переход пролиферирующих клеток из одной фазы клеточного цикла в другую контролирует набор специфических регуляторных белков и кодирующих их генов. К положительным регуляторам клеточного цикла относятся синтезирующиеся на определенных этапах комплексы циклинов и циклин-зависимых киназ и транскрипционные факторы и семейства *E2F*. К отрицательным регуляторам – белки-супрессоры *p53* и *pRb*, а также ингибиторы циклин-киназных комплексов *p15, p16* и *p21*.

Белок *pRb* ингибирует переход клетки в S-фазу и регулируется через фосфорилирование циклина D1. Последовательное и длительное фосфорилирование *pRb* ведет к его инактивации и снижению ин-

гибиторной активности [51]. Онкогенные белки ВПЧ ВКР *E6* и *E7* инактивируют *p53* и *pRb* соответственно [1; 45; 55; 62]. Как показывают многочисленные исследования, инактивация *pRb* через *p16/cdk*-циклин/*Rb* молекулярный путь, ассоциированный с увеличением экспрессии *p16* в ВПЧ-трансформированных клетках, является главным механизмом цервикального канцерогенеза. При этом основной биологической задачей данного пути является контроль прохождения клеток по фазе *G1* клеточного цикла. Недавние исследования выявили наличие взаимодействия между некоторыми видами ВПЧ и регуляторами клеточного цикла, среди которых наиболее значимы CDK и их ингибиторы CDKI [27; 47; 48; 51].

Важную роль в регуляции клеточного роста играет циклин D1. Нарушение его продукции имеют место в канцерогенезе РШМ. Циклин D1 взаимодействует с CDK4 и CDK6, в результате чего происходит накопление киназных комплексов. Киназы, фосфорилируя *pRb*, обеспечивают продвижение клетки по фазе *G1* клеточного цикла [42].

Циклин D1 определяется ИГХ в нормальном эпителии шейки матки даже при сниженной или отсутствующей экспрессии в неопластических участках [5]. Показано отсутствие циклина D1 в 87 % ВПЧ ВКР-ассоциированных тяжелых интраэпителиальных повреждений (CIN 2–3/CIS), в то время как при CIN 1–2, вызванных ВПЧ низкого онкогенного риска, экспрессия D1 сохранялась в 92 % случаев [42].

Другим маркером клеточной пролиферации может служить продукт гена *CDKN2A*, белок *p16^{INK4A}* – опухолевый супрессор, тормозящий клеточный цикл путем инактивации циклин-зависимых киназ, вовлеченных в фосфорилирование белка ретинобластомы. *pRb* – белок-супрессор опухолевого роста, который ингибирует переход в S-фазу клеточного цикла и регулируется через фосфорилирование циклина D1. Последовательное и длительное фосфорилирование *pRb* ведет к его инактивации и редукции ингибиторной активности [51].

За счет действия через путь *pRb p16* может противодействовать некоторым из нежелательных механизмов дисрегуляции клеточного цикла. Однако *pRb* оказывается заблокирован вирусным белком *E7*. Белок *E7*, малый цинк-связывающий белок, подавляет путь *pRb* на нескольких уровнях, в основном за счет связывания самого *pRb*, что приводит к его деградации и освобождению транскрипционного фактора *E2F*. В результате утрачивается транскрипционный контроль над клеточным циклом и запускается неконтролируемая пролиферация [51; 56]. В настоящее время *p16* рассматривают как потенциальный маркер прогрессии CIN. ИГХ-исследования показывают, что в неопухолевой ткани шейки матки с метапластическими, реактивными или воспалительными изменениями *p16* не экспрессируется [33]. Кроме того, в прилегающей к CIN условно нормальной ткани окрашивание антителами к *p16* также отсутствует. Практически во всех случаях CIN 1–2 имеется гиперэкспрессия *p16* [8; 22]. При CIN сильное цитоплазматическое и ядерное иммуноокрашивание *p16* резко разграничивало диспластический и нормальный эпителий [9]. В ходе многочисленных исследований экспрессия *p16* наблюдалась только в цервикальном эпителии с морфологическими признаками неоплазии и высокой пролиферативной активностью по индексу *Ki-67*. [9; 28; 49]. По данным мета-анализа, включавшего 61 исследование, в гистологических препаратах окрашивание на *p16* отмечено в 23–53 % CIN 1, в 44–92 % CIN 2 и в 72–92 % CIN 3.

В цитологических образцах *p16* экспрессируется в клетках неоплазированного эпителия шейки матки с чувствительностью 99,9 % и специфичностью 100 % [33].

Белок-продукт гена-супрессора *p53*, контролирующий вступление в S фазу клеточного цикла и играющий основную роль в пролиферации, в нормальных тканях быстро деградирует и не определяется ИГХ. Мутация или утрата *p53* характерна для многих злокачественных новообразований. Однако данные относительно состояния этого гена при РШМ противоречивы [7; 13; 24; 52]. По результатам некоторых исследований, экспрессируемый в неоплазированном эпителии *p53* в большинстве случаев неактивен, так как белок-онкоген *E6* ВПЧ ВКР увеличивает степень его деградации, что требуется для поддержания пролиферативного фенотипа неоплазированных клеток. В нормальном эпителии шейки матки *p53* не накапливается, тогда, как при CIN очаговая гиперэкспрессия маркера наблюдается в образцах тканей до 75 % случаев, а при РШМ – до 100 % [13; 15].

Количество делящихся клеток является суммарным показателем независимости от ростовых сигналов, нечувствительности к сигналам, блокирующим деление, неограниченной возможности деления и адекватного неоангиогенеза. Белок Ki-67 (MKI67), маркер клеточной пролиферации, присутствует в клетках, находящихся в фазах цикла поздней G_1 , S, G_2 и M, но не в клетках в состоянии покоя (фазы G_0 и ранняя G_1). Показано, что экспрессия Ki-67 прямо коррелирует со степенью CIN [4; 34; 59]. Критерии оценки экспрессии Ki-67 у разных авторов различны, начиная от локализации окрашивания (ядро, цитоплазма, ядро и цитоплазма), его интенсивности и заканчивая процентом Ki-67 положительных клеток в разных слоях эпителия [30]. Определение Ki-67 позволяет предсказать спонтанную регрессию CIN 1–2 или прогрессию до CIN 3 и более. Необходимо, однако, разработать более точные и стандартизованные критерии степени экспрессии Ki-67 при различных CIN и установить критический уровень показателей, свидетельствующих о неблагоприятном прогнозе.

В качестве маркера инвазии на фоне CIN предложено использовать белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста IGFBR. Экспрессия IGFBR достигает максимума при CIN 2–3, но при инвазии снижается даже ниже показателей, характерных для нормального эпителия шейки [21].

Значение молекулярно-биологических маркеров апоптоза в развитии и прогрессии CIN

Увеличение популяции опухолевых клеток происходит не только за счет фракции делящихся клеток, но также из-за блокирования механизмов апоптоза. Баланс между апоптозом и пролиферацией – критический фактор поддержания гомеостаза в многоклеточных организмах. В клетках злокачественных опухолей часто имеется нарушение механизмов апоптоза, что поддерживает неконтролируемый рост и является причиной формирования лекарственной резистентности. В процесс нарушения апоптоза вовлекаются такие молекулярные механизмы, как гиперэкспрессия анти-апоптотических белков, инактивация рецепторов апоптоза или эпигенетическая дисрегуляция генов опухолевой супрессии. Подавление апоптоза – один из ключевых факторов в развитии неоплазии эпителия на фоне персистирующей ВПЧ-инфекции [1; 45; 55; 62]. Ан-

ти-апоптотические факторы при цервикальном канцерогенезе действуют напрямую – через рецепторы апоптоза или опосредовано – за счет запуска внутриклеточных механизмов, нарушающих его сигнальные каскады. Внешний путь включается за счет активации апоптоз-индуцирующих «лигандов смерти», таких как Fas-лиганд (FasL/CD95L) и TRAIL, при их связывании с рецепторами смерти на поверхности клетки: Fas и DR4/DR5, соответственно. Каскад CD95/Fas/APO-1 является одной из наиболее изученных систем, запускающих апоптоз. Система Fas-FasL отвечает за клеточно-опосредованную цитотоксичность, регуляцию и избирательность периферического иммунного ответа, «противодействие» клеток злокачественных опухолей клеткам иммунной системы организма-хозяина. Резистентность к апоптозу через путь Fas позволяет многим опухолям избегать контакта с эффекторами иммунологического надзора. Взаимодействие Fas и FasL играет важную роль в клеточно-опосредованном апоптозе опухолевых клеток. Кроме того, имеются данные, что опухолевые клетки могут экспрессировать FasL, индуцируя апоптоз в лимфоцитах, инфильтрирующих ткани опухоли, и избегать, таким образом, иммунного контроля. Обнаружено, что полиморфизм генов Fas-670 и IL-10-592 сопряжен с большим риском развития РШМ [60]. В CIN 1–2 окрашивание антителами к FasL ограничено базальным и парабазальным слоями эпителия, а Fas рецептора – поверхностным слоем дифференцированных эпителиальных клеток. При тяжелых внутриэпителиальных повреждениях (CIN 2–3/CIS) толщина гомогенного окрашивания FasL в эпителиальном пласте прогрессивно увеличивалась, тогда, как экспрессия Fas рецептора наоборот снижалась.

Увеличение экспрессии FasL в CIN 3 и РШМ может играть функциональную роль в ускользании опухоли от иммунологического контроля [37]. Кандидатом в маркеры прогрессии CIN и начала инвазивного роста является белок, подавляющий клеточный Fas-ассоциированный апоптоз, доменоподобный интерлейкин-1-бета-конвертирующий фермент FLICE, cFLIP. Экспрессия cFLIP вообще не определяется в нормальном эпителии, но повышается прямо пропорционально степени эпителиальных повреждений, от CIN 1 до инвазивного рака [21]. Внутренний путь активации апоптоза контролируется в основном белками семейства *Bcl-2*, которые отвечают за высвобождение цитохрома C из митохондрий [11; 31]. Белки этого семейства делятся 3 подгруппы:

1. Блокирующие апоптоз (белки выживаемости) – члены семейства, структурно гомологичные *Bcl-2* (*Bcl-2*, *Bcl-x_L*, *Bcl-w* и др.);
2. Проапоптотические белки, структурно гомологичные *Bcl-2* (*Bax*, *Bad*, *Bak* и др.);
3. Проапоптотические лиганды *Bik*, *Bid*, *Bim* и др. [6].

В нормальном эпителии шейки матки наблюдается слабое и ограниченное окрашивание базального слоя антителами к *Bcl-2* (1⁺, менее 2 % клеток), тогда как при CIN отмечают увеличение, как интенсивности окрашивания, так и процента положительных клеток (2–3⁺; 15–95 %) [31].

Экспрессия *Bcl-2* при плоскоклеточном РШМ варьирует: примерно 45 % случаев имеет сильное окрашивание опухолевых клеток (2–3⁺; 30–100 %), а примерно 55 % полностью негативны по *Bcl-2*. Увеличение экспрессии *Bcl-2* при CIN может увеличивать выживаемость неоплазированных клеток путем ингибирования *p53*-зависимого апоптоза в G_1 фазе клеточного цикла.

Парадоксальная потеря *Bcl-2* при плоскоклеточном РШМ может быть связана с ответом на прямое ингибирование *p53* белком *E6* ВПЧ. Было показано, что потеря *Bcl-2* при РШМ является плохим прогностическим признаком [32]. С другой стороны, сохранение экспрессии *Bcl-2* в совокупности с рецепторами эстрогенов и прогестерона при сравнении CIN 3 с участками CIN 3 при микроинвазивном раке было расценено, как благоприятный признак низкого риска инвазии [17].

Молекулярно-биологические маркеры воспаления

Персистирующая ВПЧ-инфекция ведет к увеличению синтеза провоспалительных медиаторов, которые также вносят вклад в создание условий для развития опухолей [12].

Одним из важных ферментов, участвующим в данном процессе, является COX-2 [58]. Исследования показали, что онкобелки *E6* и *E7* ВПЧ 16-го типа увеличивают транскрипцию COX-2 через EGFR-сигнальный путь [44]. COX-2 участвует в превращении арахидоновой кислоты в простагландины и ключевые ферменты воспаления, которые также могут участвовать в канцерогенезе РШМ. Повышение синтеза и функциональной способности простагландинов приводит к снижению контроля за пролиферацией при контакте клетка-клетка, а потеря Е-кадгерина также сопровождается увеличением пролиферативной активности клеток, что является признаками злокачественной трансформации [54].

Экспрессия COX-2 ассоциирована не только с пролиферацией опухолевых клеток, но и с активацией неоплазии, блокированием апоптоза и неблагоприятным прогнозом течения некоторых опухолей [46; 16; 20]. Показано, что при CIN 3 и РШМ имеется прямая корреляция между экспрессией COX-2 и основного стимулятора неоплазии VEGF [25].

Доказана гиперэкспрессия COX-2 и простагландинов в преинвазивных CIN и инвазивном РШМ по сравнению с нормальной тканью и участками хронического воспаления шейки матки (ВПЧ-негативными) [12; 20]. По данным различных исследователей экспрессию COX-2 находят примерно в 25 % случаев CIN 3, в 38 % случаев микроинвазивного плоскоклеточного рака, в 52 % случаев инвазивного плоскоклеточного рака и в 75 % аденокарциномы шейки матки [10; 18].

Литература

1. Киселев Ф.Л., Мазуренко Н.Н., Волгарева Г.М., Киселев Н.П. Взаимодействие вирусных и клеточных генов при раке шейки матки // Мол. Биология. – 2004. – Т. 38, № 2. – С. 224–32.
2. Роговская С.И. Апоптоз при патологии шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека // Consilium Medicum: гинекология. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 55–9.
3. Снугур Н.В. Интраэпителиальные неоплазии и микроинвазивный рак шейки матки. Клинические и молекулярно-биологические особенности. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2009. – 26 с.
4. Agoff S.N., Lin P., Morihara J. et al. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types // Mod Pathol. – 2003. – 16(7). – P. 665–73.
5. Bae D.S., Cho S.B., Kim Y.J. et al. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus // Gynecol Oncol. – 2001. – 81(3). – P. 341–7.
6. Bouillet P., Strasser A. Bax and Bak: back-bone of T cell death // Nat Immunol. – 2002. – 3(10). – P. 893–4.
7. Bragança J.F., Sarian L.O., Pitta D.R. et al. Expression of p16(INK4a) and cervical infection with high-risk human papillomavirus are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia // Int J Gynecol Cancer. – 2007. – 11. – P. 134–42.
8. Branca M., Ciotti M., Santini D. et al. p16(INK4A) expression is related to grade of cin and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome // Int J Gynecol Pathol. – 2004. – 23(4). – P. 354–65.

По другим данным частота экспрессии COX-2 составляет 39% при CIN 1 или CIN 2, 80% при CIN 3 или карциноме *in situ* и 100 % при инвазивном раке [25].

Для РШМ было показано, что экспрессия COX-2 может быть прогностическим фактором, предсказывающим эффективность радиотерапии, выживаемость больных и резистентность к химиотерапии [16; 40]. Однако значение COX-2 в преинвазивных повреждениях до сих пор не определено окончательно и изучается [14].

Полагают, что ее экспрессия увеличивается в соответствии со степенью CIN и может свидетельствовать о рецидиве после органосохраняющих операций (например, конизации).

Исследование образцов тканей шейки матки от 52 пациенток, выполненное с помощью ELISA, для уточнения роли COX-2 в канцерогенезе РШМ показало, что по сравнению со здоровой тканью при предраковых повреждениях и воспалительных явлениях экспрессия COX-2 немного повышена, а при CIN 1–2 возрастает в 4,9 раза. Эти данные позволяют предположить, что COX-2 может быть перспективным биомаркером злокачественной трансформации шейки матки, и служить основой для химиотерапевтической профилактики [39].

Заключение

Развитие рака шейки матки в течение десятков лет проходит этапы предраковых повреждений с разной потенцией к регрессии, персистенции и прогрессии, связанных прямо или косвенно с пролиферацией клеток шейки матки и с процессами программированной клеточной смерти – апоптозом. В связи с этим определение диагностически значимых маркеров пролиферации и апоптоза при предраковых состояниях (CIN) чрезвычайно важно для выделения больных с высоким риском развития тяжелых повреждений и их своевременного лечения с целью предотвращения исхода CIN в инвазивный рак. В случае развития CIN или РШМ эти маркеры являются дополнительным инструментом скрининга, динамического наблюдения, оценки результатов лечения и прогноза течения заболевания. Учитывая современные тенденции к использованию мишень-направленной терапии для лечения солидных новообразований возможно применение наиболее интенсивно и устойчиво экспрессируемых маркеров в качестве объектов таргетной терапии.

9. Bulten J., van der Avoort I.A., Melchers W.J. et al. p14ARF and p16INK4A, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia // *Gynecol Oncol.* – 2006. – 101(3). – P. 487–94.
10. Chen Y.J., Wang L.S., Wang P.H. et al. High cyclooxygenase-2 expression in cervical adenocarcinomas // *Gynecol Oncol.* – 2003. – 88(3). – P. 379–85.
11. Cory S., Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – 2(9). – P. 647–56.
12. Dai Y., Zhang X., Peng Y., Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma // *Gynecol Oncol.* – 2005. – 97(1). – P. 96–103.
13. Dimitrakakis C., Kymionis G., Diakomanolis E. et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions // *Gynecol Oncol.* – 2000. – 77(1). – P. 129–36.
14. Farley J., Uyehara C., Hashiro G. et al. Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure // *Gynecol Oncol.* – 2004. – 92(2). – P. 596–602.
15. Feng W., Xiao J., Zhang Z. et al. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma // *Mod Pathol.* – 2007. – 20(9). – P. 961–6.
16. Ferrandina G. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in tumour and stroma compartments in cervical cancer: clinical implications // *British Journal of Cancer.* – 2002. – 87. – P. 1145–1152.
17. Fonseca-Moutinho J.A., Cruz E., Carvalho L. et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 are markers with prognostic significance in CIN III // *Int J Gynecol Cancer.* – 2004. – 14(5). – P. 911–20.
18. Gaffney D.K., Holden J., Zempolich K. et al. Elevated COX-2 expression in cervical carcinoma: reduced cause-specific survival and pelvic control // *Am J Clin Oncol.* – 2001. – 24(5). – P. 443–6.
19. Goldhaber-Fiebert J.D., Stout N.K., Salomon J. et al. Costeffectiveness of cervical cancer screening with human papillomavirus DNA testing and HPV-16,18 vaccination // *J Natl Cancer Inst.* – 2008. – 100. – P. 308–20.
20. 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.
21. Hou X.J., Zhang Y.Z., Liu X. et al. Expressions of IGFBP-5, cFLIP in cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma and their clinical significances: a molecular pathology // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2009. – 28. – P. 70.
22. Ikeda K., Tate G., Suzuki T., Mitsuya T. Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: An immunohistochemical analysis and review of the literature // *Gynecol Oncol.* – 2008. – 11. – P. 314–8.
23. Keating J.T., Ince T., Crum C.P. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis // *Adv Anat Pathol.* – 2001. – 8. – P. 83–92.
24. Kim J.W., Lee C.G., Park Y.G. et al. Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma // *Cancer.* – 2000. – 88(9). – P. 2082–91.
25. Kim J.Y., Lim S.J., Park K. et al. Cyclooxygenase-2 and c-erbB-2 expression in uterine cervical neoplasm assessed using tissue microarrays // *Gynecol Oncol.* – 2005. – 97(2). – P. 337–41.
26. Kiviat N.B., Hawes S.E., Feng Q. Screening for cervical cancer in the era of the HPV vaccine—the urgent need for both new screening guidelines and new biomarkers // *J Natl Cancer Inst.* – 2008. – 100. – P. 290–1.
27. Klaes R., Benner A., Friedrich T. et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia // *Am J Surg Pathol.* – 2002. – 26(11). – P. 1389–99.
28. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D. et al. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri // *Int J Cancer.* – 2001. – 92. – P. 276–84.
29. Kovanda A., Juvan U., Sterbenc A. et al. Pre-vaccination distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) lesions in Slovenia // *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* – 2009. – 18(2). – P. 47–52.
30. Kruse A.J., Baak J.P., Janssen E.A. et al. Low- and high-risk CIN 1 and 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables // *J Pathol.* – 2003. – 199(4). – P. 462–70.
31. Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G. et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane // *Cell.* – 2002. – 111(3). – P. 331–42.
32. Munakata S., Watanabe O., Ohashi K., Morino H. Expression of Fas ligand and bcl-2 in cervical carcinoma and their prognostic significance // *Am J Clin Pathol.* – 2005. – 123(6). – P. 879–85.
33. Murphy N., Ring M., Killalea A.G. et al. P16^{INK4a} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrepTM smears // *J Clin Pathol.* – 2003. – 56. – P. 56–63.
34. Nam E.J., Kim J.W., Hong J.W. et al. Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection // *J Gynecol Oncol.* – 2008. – 19(3). – P. 162–8.
35. Nauciler P., Ryd W., Törnberg S. et al. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening // *J Natl Cancer Inst.* – 2009. – 101(2). – P. 88–99.
36. Petry K.U. Textbook of Gynecological Oncology. – Güneş Publishing, 2009. – P. 63–6.
37. Reesink-Peters N., Hougardy B.M., van den Heuvel F.A. et al. Death receptors and ligands in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study // *Gynecol Oncol.* – 2005. – 96(3). – P. 705–13.
38. Rocha A.S., Bozzetti M.C., Kirschnick L.S., Edelweiss M.I. Antibody anti-p16(INK4a) in cervical cytology // *Acta Cytol.* – 2009. – 53(3). – P. 253–62.
39. Saldivar J.S., Lopez D., Feldman R.A. et al. COX-2 overexpression as a biomarker of early cervical carcinogenesis: a pilot study // *Gynecol Oncol.* – 2007. – 107(1). – P. 155–62.
40. Sarian L.O., Derchain S.F., Yoshida A. et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix // *Gynecol Oncol.* – 2006. – 102(3). – P. 537–41.

41. Schiffman M. Integration of human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing // Cancer. – 2007. – 111. – P. 145–53.
42. Skomedal H., Kristensen G.B., Nesland J.M. et al. TP53 alterations in relation to the cell cycle-associated proteins p21, cyclin D1, CDK4, RB, MDM2, and EGFR in cancers of the uterine corpus // J Pathol. – 1999. – 187(5). – P. 556–62.
43. Soutter W.P., Butler J.S., Tipples M. The role of colposcopy in the follow up of women treated for cervical intraepithelial neoplasia // BJOG. – 2006. – 113(5). – P. 511–4.
44. Subbaramaiah K., Dannenberg A.J. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange // Cancer Res. – 2007. – 67(8). – P. 3976–85.
45. Syrjänen S.M., Syrjänen K.J. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation // Ann Med. – 1999. – 31(3). – P. 175–87.
46. Tatsuguchi A., Matsui K., Shinji Y. et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue // Hum Pathol. – 2004. – 35(4). – P. 488–95.
47. Tjalma W.A., Arbyn M., Paavonen J. et al. Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer // Int J Gynecol Cancer. – 2004. – 14(5). – P. 751–61.
48. Tota J., Franco E.L. HPV infection and cervical cancerogenesis: epidemiology and prevention. – Textbook of Gynecological Oncology. – Güneş Publishing, 2009. – P. 49–52.
49. Tsoumpou I., Arbyn M., Kyrgiou M. et al. p16^{INK4a} immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis // Cancer Treatment Reviews. – 2009. – 35(3). – P. 210–20.
50. Ullal A., Roberts M., Bulmer J.N. et al. The role of cervical cytology and colposcopy in detecting cervical glandular neoplasia // Cytopathology. – 2008. – 20(6). – P. 359–366.
51. Vaknin Z., Gotlieb W.H. Textbook of Gynecological Oncology. – Güneş Publishing, 2009. – P. 79–84.
52. Vassallo J., Derchain S.F., Pinto G.A. et al. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia // Int J Gynaecol Obstet. – 2000. – 71(1). – P. 45–8.
53. Walker P. The natural history of cervical cancer // Workshop book 25th International Conference Clinical and Educational Workshop 8–14 мая 2009, Мальмо, Швеция. – P. 109–24.
54. Weinberg R.A. Is metastasis predetermined? // Mol Oncol. – 2007. – 1(3). – P. 263–4.
55. Wells S.I., Aronow B.J., Wise T.M. et al. Transcriptome signature of irreversible senescence in human papillomavirus-positive cervical cancer cells // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – 100(12). – P. 7093–8.
56. Wentzensen N. and von Knebel D.M. Biomarkers in cervical cancer screening // Dis Markers. – 2007. – 23. – P. 315–30.
57. www.who.int/hpvcentre
58. Young J.L. Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: a review // Gynecol Oncol. – 2008. – 109(1). – P. 140–5.
59. Yu L., Wang L., Zhong J., Chen S. Diagnostic value of p16INK4A, Ki-67, and human papillomavirus 11 capsid protein immunohistochemical staining on cell blocks from residual liquid-based gynecologic cytology specimens // Cancer Cytopathol. – 2010. – 1. – P. 32–8.
60. Zoodma M., Nolte I.M., Schipper M. et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease // Int J Gynecol Cancer. – 2005. – 15(Suppl. 3). – P. 282–90.
61. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis // J Natl Cancer Inst. – 2000. – 92. – P. 690–8.
62. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application // Nat Rev Cancer. – 2002. – 2(5). – P. 342–50.

Н.А. Калягина^{1,2}, В.Б. Лощенко¹, К.В. Родионов¹, Д. Вольф², В. Блондель², К. Даль²

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕТОДА ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДИФфуЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ СВЕТА К РАССЕИВАЮЩИМ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦАМ НА ОПТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

¹Институт Общей Физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

²Национальный Политехнический Институт Лотарингии, Франция, Нанси

Задачи исследования. В большинстве случаев злокачественные новообразования мочевого пузыря возникают в эпителии. Как правило, незначительные патологические изменения ткани, такие, как при дисплазии, предшествуют раку. Многие диспластические новообразования не сильно отличаются от окружающих здоровых тканей, что затрудняет диагностику. Одной из главных особенностей таких предраковых состояний является изменения диаметра клеточных ядер. Метод визуализации диффузного отражения и спектроскопия диффузного отражения являются информационными методами для *in vivo* диагностики тканей. Эти методы являются чувствительными к некоторым рассеивающим центрам тканей, таким как клетки и ядра, которые отвечают за распределение света внутри ткани. Таким образом, целью данной работы является изучение распределения пространственной интенсивности обратно рассеянного монохроматического света в многослойных экспериментальных моделях (имитирующих слизистую оболочку мочевого пузыря) с различными размерами рассеивающих частиц.

Материалы и методы. Трехслойные макеты с полимерными нано- и микро- частицами были созданы для имитации свойств поглощения и рассеяния лазерного излучения слизистой оболочкой мочевого пузыря. Измерения проводились с помощью оптического волокна с микролинзой, источника лазерного излучения (532 нм), эндоскопа и цветной высокочувствительной камеры.

Результаты и выводы. Полученные изображения показывают пространственное распределение обратно отраженного света на поверхности ткани. В результате обработки изображений получены 3-D диаграммы интенсивности распределения света на поверхности образцов. В центре изображения содержится информация о прямо отраженном лазерном свете, а вокруг центральной области - информация о диффузно отраженном.

Интенсивность рассеянного света увеличивалась ростом диаметра нано- и микросфер. Такая информация может быть использована при оценке состояния ткани, а именно для выявления отличий воспаления, дисплазии, карциномы *in situ* и некоторых других патологических форм ткани.

УДК 616-006-085.371:616-097.1

И.Н. Михайлова¹, Д.А. Ковалевский², Р.Ш. Бибилашвили²**РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ АНТИГЕНЫ****КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ВАКЦИНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ**¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий, Москва**Контактная информация:**

Ковалевский Дмитрий Анатольевич, младший научный сотрудник лаборатории генной инженерии Института экспериментальной кардиологии

адрес: 121552, Москва, 3-я Черепковская, д. 15А; **тел.** +7(495)414-66-82;**e-mail:** dmitryk@cardio.ru

Статья поступила: 05.05.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Раково-тестикулярные гены обычно экспрессируются в зародышевых клетках, но также активны в различных типах опухолях и часто кодируют антигены, которые являются иммуногенными у больных опухолями. Эти свойства раково-тестикулярных генов предоставляют потенциальную возможность для их использования как биомаркеры и в качестве мишеней для иммунотерапии. Многие патофизиологические исследования предполагают наличие гематотестикулярного барьера. Поскольку сперматогенез начинается во время полового созревания, новые антигены на поверхности клеток экспрессируются, когда иммунная система приобрела способность отличать свои антигены от не своих. Таким образом, сперматозоиты в тестикулах не стимулируют иммунные ответы. Тестикулы рассматриваются как иммунопривилегированная область и специфичные для тестикул гены в случае экспрессии в опухолях могут быть иммуногенными. По этой причине раково-тестикулярные антигены могут быть кандидатами для иммунотерапии опухолей и в последние годы стали главной целью клинических испытаний противоопухолевых вакцин. Эти антигены могут также использоваться как биомаркеры для раннего обнаружения злокачественных новообразований.

Ключевые слова: раково-тестикулярных антигены, вакциноterapia, опухоли.I.N. Mikhaylova¹, D.A. Kovalevsky², R.Sh. Beabekashvili²**CANCER/TESTIS ANTIGENS****AS POTENTIAL TARGETS FOR VACCINOTHERAPY OF TUMOURS**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²Russian Cardiology Scientific and Clinical Complex, Moscow**Abstract**

Cancer/Testis (CT) genes are known to be expressed in germ line cells. Recently, it was shown that these genes are activated in a wide range of cancer types and are immunogenic in cancer patients. These peculiar features of cancer/testis genes could be useful as targets for immunotherapy and also as biomarkers of diagnosis cancer. Many pathophysiologic studies suggest that a blood-testis barrier exists in the testis. Because spermatogenesis begins at puberty, new cell-surface antigens are expressed when the immune system has refined the ability to distinguish self from nonself. So, sperms in the testis do not stimulate immune responses. Based on these observations testis was considered as an immune-privileged site. Testis-specific genes, if expressed in cancers could be immunogenic. For this reason cancer-testis antigens are promising candidates for cancer immunotherapy and have become a major focus for the development of vaccine-based clinical trials in recent years. In addition, these antigens can also be used as biomarkers for early detection of cancers.

Key words: cancer/testis antigen genes, vaccine therapy, tumors.**Введение**

Исследование антигенных различий трансформированных опухолевых клеток от нормальных является ключевым вопросом иммунологии злокачественных опухолей. Такие исследования позволяют выяснить механизмы малигнизации, прогрессирования опухоли, ускользание опухоли от иммунного надзора организма, что позволяет улучшить клиническую диагностику и иммунотерапию опухоли. Прогресс иммунотерапии опухолей связан с увеличением числа идентифицированных опухолевых антигенов и созданием их более иммуногенных форм. В онкологии термин «иммуногенность» используется для характеристики опухолевых антигенов, участвующих в формировании противоопухолевого иммунитета. Современная эра онкоиммунологии началась с открытия опухолевых антигенов Л.А. Зильбером и др., и разра-

ботки методов формирования специфического иммунного ответа против них. Этот подход лежит в основе создания противоопухолевых вакцин, с которыми связаны перспективы существенного повышения эффективности противоопухолевой иммунотерапии. В настоящее время все выявленные опухолевые антигены классифицируются на опухолеспецифичные и опухолеассоциированные антигены [1].

Опухолеспецифические антигены

Делят на три группы. Первая и вторая – это уникальные и общие мутантные антигены, синтезирующиеся только в неопластических клетках и происходящие из-за изменения нормального белка в результате генных мутаций, транслокаций, транскрипций со сдвигом рамки считывания или альтернативных рамок считывания, посттрансляционных нарушений (нарушение сплайсинга).

Третья – вирусные опухолевые антигены, появление которых связано с инфицированием вирусами при возникновении опухоли.

Опухолеассоциированные антигены

Делят на три группы.

1. Дифференцировочные антигены, антигены соответствующей нормальной ткани, характерные для определенного этапа ее развития и экспрессия которых обычно повышается в опухолевых клетках, например эмбриоспецифические или онкофетальные антигены, в норме характерные для эмбрионального периода развития.
2. Гетероорганные антигены, нормальные клеточные антигены, специфичные для других тканей, но не гомологичные опухолевой ткани. Такие антигены возникают в результате активации генов, «молчащих» в нормальных клетках.
3. Амплифицированные/гиперэкспрессируемые генные продукты и универсальные опухолевые антигены; экспрессия генов последних наблюдается в большинстве злокачественных новообразований и является необходимой для онкогенного процесса [1].

Раково-тестикулярные антигены (РТА) относятся к опухолеассоциированным антигенам. В данном обзоре будут рассмотрены гены раково-тестикулярных антигенов как потенциальные мишени для вакцинотерапии опухолей. РТА выявляются в опухолях различных типов, в норме синтезируются в яичках в сперматогониях, сперматиде и сперматозоидах, а также выявлены в трофобласте, и в незрелых герминальных (эмбриональных) клетках в фетальных яичниках и плаценте.

Не для всех белков РТА показаны эпитопы, узнаваемые Т-клетками иммунной системы, и не все РТА используются при иммунотерапии опухолей.

Классификация

раково-тестикулярных антигенов

Критерии отнесения генов к РТА. Приписывание генов к генному семейству РТА основано на нескольких характерных особенностях [70; 89]:

1. Преобладающая экспрессия генов РТА в эмбриональных (зародышевых) клетках яичка и отсутствие экспрессии в других нормальных тканях;
2. Экспрессия генов РТА во многих злокачественных опухолях различных гистологических типов;
3. Картография гена на Х-хромосоме;
4. Членство в мультигенной семье;
5. Аллергенные свойства в пациентах, имеющих опухоль.

Наиболее часто РТА определяют, основываясь на двух аспектах.

Во-первых – для многих генов РТА не показано, что они действительно кодируют эпитопы, которые узнаются Т-клетками как антигенные детерминанты.

Во-вторых, белки РТА не являются антигенами, если экспрессируются в яичке, так как в яичке не экспрессируются молекулы HLA, которые необходимы для презентации и узнавания Т-клетками иммунной системы [42]. По этой причине Т. Boon et al. предпочитают термин *общие опухоли-специфичные антигены* (tumor-specific shared antigens) [8]. Раково-тестикулярные антигены идентифицированы несколькими методами:

- 1) клонирование эпитопов для узнавания аутологичными цитотоксическими Т-лимфоцитами пациента РТА [90; 92; 93];
- 2) серологический анализ экспрессирующихся кДНК библиотек (SEREX) [17; 36; 89];
- 3) анализ дифференциальной экспрессии генов [55; 59; 74; 100; 102];
- 4) биоинформационный метод [10; 11; 58; 79; 80; 103].

К настоящему времени каталог РТА содержит около 50 семейств, некоторые из которых имеют несколько членов, такие как семейство MAGEA или GAGE1, а также сплайсинговые формы, такие как XAGE1 и XAGE1b, что в итоге суммируется более 150 членов группы раково-тестикулярных антигенов [23]. 30 генов из 110 [23] семейства РТА локализованы на Х-хромосоме (Х-РТА), остальные распределены по всему геному в виде отдельных генных представителей.

Характерной чертой для генов расположенных на Х-хромосоме является мультикопийность по причине дупликации и образование кластеров. Эти повторы могут быть инвертированными, например ST45, или прямыми как ST47. Последовательности генов РТА занимают ~10 % последовательностей Х-хромосомы [77].

Подобные результаты были получены для генома мыши, у которой 36 мультикопийных генов были найдены на Х-хромосоме, в количестве от 2 до 28 копий для одного гена.

По сравнению с генами Х-РТА, гены не расположенные на Х-хромосоме являются однокопийными и не объединяются в кластеры. Эти различия также отражены в характере экспрессии генов и функциональных характеристиках. Раково-тестикулярные антигены на Х-хромосоме обладают большим потенциалом для использования их в качестве мишеней опухолевых вакцин.

Экспрессия раково-тестикулярных антигенов

Экспрессия генов РТА в опухолях на уровне мРНК

Аберрантная активация и экспрессия мРНК транскриптов в различных опухолях человека является определяющей характеристикой генов РТА. Характеристики, относящиеся к продуктам генов РТА как мишеням иммунотерапии:

- 1) различные типы опухолей значительно отличаются друг от друга по частоте экспрессии мРНК РТА,
- 2) для определенного типа опухоли, опухоли с высокой степенью злокачественности и поздней клинической стадией часто демонстрируют большую частоту экспрессии генов РТА,
- 3) гены РТА экспрессируются в опухоли совместно, то есть, если опухоль положительна по одному гену РТА, часто одновременно экспрессируется более чем один ген РТА. Различные типы опухолей, такие как меланома, рак яичников, рак легких, демонстрируются очень высокую частоту экспрессии генов РТА. Напротив, гемопоэтические опухоли, такие как лимфомы и лейкозы, а также рак почки, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы показывают низкую частоту экспрессии генов РТА. Эпителиальные опухоли, такие как рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак простаты демонстрируют средний уровень частоты экспрессии генов РТА (табл. 1).

Высокая степень злокачественности опухоли и наличие метастазов показывают более высокую частоту экспрессии генов РТА, чем первичные опухоли. Например, ген *CTAG1B* экспрессируется в 40 % при 3 степени злокачественности и в 23 % при 2 степени злокачественности, но не обнаруживается при 1 степени злокачественности [51]. Ген *MAGEA1* экспрессировался в 48 % в метастатической меланоме против 16 % в первичной меланоме [9].

Примером согласованной экспрессии нескольких генов РТА в одной опухоли может быть рак легкого [34]. С другой стороны некоторые опухоли демонстрируют отсутствие экспрессии какого либо тестируемого гена РТА.

Явление координированной экспрессии (или её отсутствие) показано на клеточной линии SK-MEL-37, в которой экспрессировались почти все исследуемые гены РТА [18]. Многие из генов РТА были впервые обнаружены в клетках меланомы [22, 24, 78, 101].

Так для семейства *MAGE-A* частота экспрессии в метастазах меланомы составляет около 80 % (число образцов, в которых обнаружена экспрессия к общему числу образцов). Для генов *SSX-2*, *CTAG1B*, *MAGE-C1*, *GAGE-1/2*, *BAGE* меняется от 20 до 50 % по данными ОТ-ПЦР. В некоторых случаях уровень экспрессии составлял от 4 до 17 %. Более чем 95 % метастазов меланомы были ОТ-ПЦР положительными хотя бы по одному гену из числа исследованных. Для некоторых генов РТА высокий уровень экспрессии в метастазах по сравнению с первичными опухолями подсказывал наличие корреляции между экспрессией генов и опухолевой дедифференцировкой [102; 103].

В некоторых случаях частота экспрессии в первичных опухолях и метастазах была одинаковой [100], а в некоторых экспрессия была преимущественно в первичных опухолях и почти отсутствовала в метастазах [33].

Увеличение уровня дедифференцировки в течение прогрессии опухоли, возможно, приводит к депрессии контроля транскрипции в экспрессии этих РТА генов [17]. В табл. 1 приведены данные по экспрессии раково-тестикулярных генов в различных типах опухолей.

Экспрессия генов РТА на уровне мРНК в нормальных тканях

Кроме экспрессии в яичках некоторые гены РТА экспрессируются в плаценте, а именно гены: *MAGEA3*, *MAGEA10*, *MAGEA8*, *XAGE2*, и *XAGE3*. И наоборот специфичный для плаценты ген *PLAC1/CT92* экспрессируется в яичках, но на низком уровне [84]. Кроме экспрессии в плаценте, многие гены РТА показали низкий уровень экспрессии мРНК в ограниченном числе соматических тканей. Однако по данным количественного ОТ-ПЦР уровень экспрессии этих генов в не-тестикулярных тканях обычно <1% их уровня экспрессии в тестикулах.

Этот низкий уровень экспрессии генов РТА никогда не подтверждался на уровне белка при иммуногистохимическом анализе анти-РТА антителами и вопрос о том, транслируется ли такая «слёзная» величина экспрессии генов РТА на уровне мРНК на биологически значимом уровне белка остается дискуссионным. С другой стороны, некоторые гены РТА, такие как *KDM5B/CT31(JARID1B)* и *SPA17* имеют значительный уровень экспрессии в нормальных тканях. Таким образом, на основании признанного уровня экспрессии генов РТА в нормальных тканях, O. Hofmann et al. классифицировали 153 генов РТА [38], на три категории:

- тестикулярно-ограниченные (*testis-restricted*),
- тестикулярно-селективные (*testis-selective*), в последнем случае гены преобладающее экспрессируются в тестикулах, но ими не ограничиваются,
- тестикулярно-энцефалитно селективные (*testis/brain-selective*), которые экспрессируются в тестикулах и головном мозге.

Отметим, что 35 из 39 тестикулярно-ограниченных генов были генами Х-РТА и только 4 были не-Х-РТА генами. Такая диспропорция расположения тестикулярно-ограниченных генов на Х-хромосоме связана с фактом, что большинство иммуногенных раково-тестикулярных антигенов (*MAGEA*, *CTAG1B*, *SSX*) также входит в подгруппу Х-РТА. Можно предположить, что гены Х-РТА также, вероятно, наиболее интересны с иммунотерапевтической точки зрения.

Экспрессия генов РТА на уровне белка

Использование поликлональных и моноклональных антител в иммуногистохимических методах продемонстрировало экспрессию генов РТА на уровне белка в нормальных и опухолевых тканях и определило по-крайней мере три общие закономерности экспрессии генов РТА на уровне белка в яичках:

- 1) преобладающая экспрессия в сперматогониях, самообновляющейся клеточной популяции эмбриональных стволовых клеток в яичках взрослых людей; в основном как белок ядра;
- 2) преобладающая экспрессия в первичных и вторичных сперматоцитах; также как белок ядра;
- 3) ограниченная экспрессия в зрелых клетках спермы; в основном как цитоплазматический белок.

Большинство генов Х-РТА (*CTAG1B*, *MAGEA*, *MAGEC1*, *MAGEC2*, *GAGE*, *CT47*, *SAGE1*, *NXF2*) относится к первой группе, с экспрессией в сперматогониях. В основном это ядерные антигены, но в незначительном количестве представлены и в цитоплазме.

Преобладание экспрессии этой группы генов в цитоплазме встречается редко, например, для гена *CT47*. По сравнению с этой группой генов некоторые гены РТА экспрессируются в основном и исключительно на стадии сперматоцитов, гены эти являются в основном ядерными белками, и содержат белки, относящиеся к мейозу, например *SYCP1(SCP1)*, *HORMAD1* и *CT45*.

Третья группа состоит из генов, которые экспрессируются только в зрелых клетках, постмейозных клетках спермы, например, ген *COX6B2* (изоформа цитохром С оксидазы, субъединица VIb). Из генов Х-РТА к этой группе генов принадлежит семейство генов *SPANX*, состоящее из пяти членов. Экспрессия генов РТА на уровне белка в опухолях проанализирована для нескольких РТА (*CTAG1B*, *MAGE-A*, *GAGE*, *MAGEC1* и *MAGE-C2* и *CT45*) [19]. Из анализа можно заметить некоторые характерные черты:

1. Большинство генов РТА продемонстрировали экспрессию на уровне белка в опухолях, за некоторыми исключениями;
2. Экспрессия белка РТА коррелирует с уровнем экспрессии мРНК, опухоли с высоким уровнем экспрессии мРНК, >1–10 % уровня экспрессии мРНК в яичках, демонстрировали также и экспрессию белка;
3. Экспрессия белка РТА в опухолях чаще гетерогенная, а высокий уровень экспрессии в очень небольших участках опухолевых клетках наблюдался не часто.

Таблица 1

Частота (%) экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов в различных опухолях

Семейство РГА генов	Мочевотог пугзря	Головного мозга	Молочного железы	Толстого кишечника	Пищевода	Желудка	Щитовидной железы	Головы и шеи	Печени	Лейкемии/Лимфомы	Летких (HMRJ)	Меланомы	Линичника	Поджелудочной железы	Простаты	Семиномы	несеминиовальных зародышневых клеток	Почек	Саркомы	Литература
MAGEA1/CT1.1	22	–	18	2	53	29	17	28	80	0	49	48	28	–	15	54	20	0	14	[62; 91; 99]
BAGE1/CT2.1	15	–	10	0	–	–	9	8	–	0	4	26	15	–	0	–	–	0	6	[62; 91]
MAGEB1/CT3.1	0	0	17	0	–	0	–	0	–	0	14	22	–	–	0	100	20	0	9	[61; 99]
GAGE/CT4.1	12	–	9	0	–	–	13	19	38	1	19	28	31	21	10	54	0	0	25	[50; 60; 62; 91; 99]
SSX2/CT5.2	44	6	7	12	–	–	4	35	9	36	16	35	–	0	40	–	–	5	50	[50; 60; 89]
CTAG1B/CT6.1	80	0	30	0	–	0	65	–	29	0	17	34	25	0	25	46	0	9	0	[17; 62; 99]
MAGEC1/CT7.1	44	–	30	10	–	–	–	36	–	–	33	70	–	–	–	–	–	–	60	[16]
SYCP1/CT8	–	47	20	0	–	7	–	–	28	0	7	14	0	48	0	39	0	8	0	[50; 60; 89; 99]
BRDT/CT9	0	–	0	0	8	–	–	8	–	–	25	0	–	–	–	–	–	0	–	[79]
MAGEC/CT10	44	–	38	0	–	–	–	36	–	–	24	50	–	–	–	–	–	–	0	[35]
SPANXC/CT11.3	9	–	25	22	0	–	–	–	–	–	33	70	–	0	–	–	–	–	–	[100]
XAGE1a/CT12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	8	–	–	–	–	–	–	22	[102; 103]
DDX43/CT13	24	37	5	31	27	–	–	–	20	9	32	17	–	–	22	–	–	6	20	[63]
SAGE1/CT14	12	0	5	0	20	–	–	17	–	4	22	4	–	–	0	–	–	5	5	[63]
ADAM2/CT15	–	–	0	0	–	–	–	–	–	–	0	0	0	–	–	–	–	12	–	[80]
PAGE5/CT16	–	–	5	11	–	–	–	–	–	–	39	22	0	–	–	0	0	44	–	[80; 99]
LIP1/CT17	–	–	5	0	–	–	–	–	–	–	0	0	0	–	–	–	–	25	–	[80]

Функции генов раково-тестикулярных антигенов

РТА семейство генов	п генов в се- мействе	Экспрессия в ходе созревания мужских половых клеток	Функция
КОДИРУЕМЫЕ ГЕНАМИ X-ХРОМОСОМЫ			
CAGE1	1	Сперматиды, сперматозоиды	Возможно, геликаза
CSAG1	2	Не определена	Неизвестна
SPANXC	4	Сперматиды	Неизвестна
TFDP3	1	Не определена	Транскрипционный фактор
FATE1	1	Не определена	Неизвестна
FTHL17	1	Сперматогонии	Возможно, белок, подобный тяжелому полипептиду ферритина
GAGE1	8	Не определена	Неизвестна
LUZP4	1	Не определена	Возможно, белок, регулирующий транскрипцию
IL13RA2	1	Не определена	Рецептор интерлейкина-13
MAGEA	12	Сперматогонии	Трансляционный корепрессор; для MAGEs значение роли обосновывается через транскрипционное регулирование контроля над циклом клетки и апоптозом
MAGEB	4	Мигрирующие примордиальные зародышевые клетки	Неизвестна
MAGEC1	2	Не определена	Неизвестна
MAGEC2	1	Не определена	Неизвестна
VENTXP1	1	Не определена	Гены гомеобокса кодируют ДНК связывающие белки, участвуют в раннем эмбриогенезе (псегдоген).
NXF2	1	Сперматогонии	Экспорт мРНК в цитоплазму
CTAG1B	3	Сперматогонии	Неизвестна
FMR1NB	1	Не определена	Неизвестна
PAGE5	2	Не определена	Неизвестна
SAGE1	1	Не определена	Неизвестна
SSX2	5	Не определена	Репрессор транскрипции, продукты генов SSX – могут функционировать как транскрипционные репрессоры; гены – SSX1, SSX2 и ген SSX4 были вовлечены в t (X; 18) транслокацию, найденную во всех синовиальных саркомах.
TAF7L	1	Сперматогонии	X-связанный ген, является аутосомальным транскрипционным фактором TAF7
XAGE1	8	Не определена	Неизвестна

КОДИРУЕМЫЕ ГЕНАМИ НЕ X-ХРОМОСОМЫ			
ADAM2	1	Сперматоциты, сперматиды	Связывание мембран сперматозоида и яйцеклетки
CASC5	1	Не определена	Возможно, супрессор клеточной пролиферации
BAGE	5	Сперматогонии	Неизвестна
CTCF	1	Сперматоциты	Возможно, регулятор транскрипции, вовлечен в отмену импринтинга путём эпигенетического перепрограммирования во время заключительной стадии митоза в сперматогенезе
BRDT	1	Не определена	Подобен семейству белков RING3. Обладает 2 мотивами бромодоменов (bromodomain) и последовательностью PEST (пролин, глутаминовая кислота, серин, и треонин) характерной для белков, которые подвергаются быстрой внутриклеточной деградации. Бромодомен (bromodomain) найден в белках, которые регулируют транскрипцию
CTAGE1	2	Не определена	Неизвестна
DSCR8	2	Не определена	Неизвестна
DDX43	1	Не определена	АТФ-зависимая РНК-геликаза
LDHC	1	Сперматоциты	Лактатдегидрогеназа, катализирует превращение L-лактата и NAD из пирувата и NADP
LIPI		Не определена	Мембрано-связанная фосфолипаза A1 бета
MORC1	1	Сперматогонии	Участвует в сперматогенезе, возможно, запускает апоптоз.
ACRBP	1	Сперматоциты, сперматиды	Связывается с проакрозином, опосредуя его упаковку и конденсацию в акросомальном матриксе
KDM5B	1	Сперматогонии	Репрессор транскрипции
SYCP1	1	Сперматоциты	Структурный компонент синаптонемного комплекса
DKKL1	1	Не определена	Участвует в передаче сигнала. Секретирующийся белок, относящийся к семейству белков Dickkopf, вовлечён в подавление схемы трансдукции сигнала Wnt, который управляет активацией транскрипции генов, таких как c-myc, c-jun, Fra и циклина D1
SPA17	1	Сперматоциты, сперматиды	Связывание сперматозоида с zona pellucida яйцеклетки и другие клеточно-клеточные адгезионные функции
SPO11	1	Сперматогонии	Образование двунитевых разрывов гомологичных хромосом
TDRD1	2	Сперматогонии	Связывается с РНК
TEX15	1	Сперматогонии	Не известна
TPTE	1	Сперматоциты II порядка и (или) пре-сперматиды	Трансмембранная тирозинфосфатаза
CRISP2	1	Сперматоциты	Опосредует связывание сперматогенных клеток к клеткам Сертоли
PRSS50	1	Сперматоциты	Специфическая тестикулярная протеаза

Литература

1. Тюреева И.И. Опухолевые антигены // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 3. – С. 189–209.
2. Adair S.J., Carr T.M., Fink M.J. et al. The TAG family of cancer/testis antigens is widely expressed in a variety of malignancies and gives rise to HLA-A2-restricted epitopes // J Immunother. – 2008. – 31(1). – P. 7–17.
3. Adams S., O'Neill D.W., Nonaka D. et al. Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant // J Immunol. – 2008. – 181(1). – P. 776–84.
4. Atanackovic D., Altorki N.K., Cao Y. et al. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – 105(5). – P. 1650–5.
5. Bai S., He B., Wilson E.M. Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction // Mol Cell Biol. – 2005. – 25. – P. 1238–57.
6. Barrett A., Madsen B., Copier J. et al. PLU-1 nuclear protein, which is upregulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? // Int J Cancer. – 2002. – 101. – P. 581–8.
7. Bart J., Groen H.J., van der Graaf W.T. et al. An oncological view on the blood-testis barrier // Lancet Oncol. – 2002. – 3(6). – P. 357–63.
8. Boon T., van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes // J Exp Med. – 1996. – 183(3). – P. 725–9.
9. Brasseur Fr., Rimoldi D., Liénard D. et al. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma // Int J Cancer. – 1995. – 63(3). – P. 375–80.
10. Brinkmann U., Vasmataz G., Lee B. et al. Novel genes in the PAGE and GAGE family of tumor antigens found by homology walking in the dbEST database // Cancer Res. – 1999. – 59(7). – P. 1445–8.
11. Brinkmann U., Vasmataz G., Lee B. et al. PAGE-1, an X chromosome-linked GAGE-like gene that is expressed in normal and neoplastic prostate, testis, and uterus // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. – 95(18). – P. 10757–62.
12. Busam K.J., Iversen K., Berwick M. et al. Immunoreactivity with the anti-MAGE antibody 57B in malignant melanoma: frequency of expression and correlation with prognostic parameters // Mod Pathol. – 2000. – 13(4). – P. 459–65.
13. Busso D., Cohen D.J., Hayashi M. et al. Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction // Mol. Hum. Reprod. – 2005. – 11. – P. 299–305.
14. Caballero O.L., Chen Y.T. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy // Cancer Sci. – 2009. – 100(11). – P. 2014–21.
15. CancerImmunity. [online]. [Обращение к документу: 01.12.2009]. Доступ через <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>.
16. Chen M.E., Lin S.H., Chung L.W., Sikes R.A. Isolation and characterization of PAGE-1 and GAGE-7. New genes expressed in the LNCaP prostate cancer progression model that share homology with melanoma-associated antigens // J Biol Chem. – 1998. – 273(28). – P. 17618–25.
17. Chen Y.T., Boyer A.D., Viars C.S. et al. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28 // Cytogenet Cell Genet. – 1997. – 79(3–4). – P. 237–40.
18. Chen Y.T., Gure A.O., Tsang S. et al. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. – 95. – P. 6919–23.
19. Chen Y.T., Hsu M., Lee P. et al. Cancer/testis antigen CT45: analysis of mRNA and protein expression in human cancer // Int J Cancer. – 2009. – 124(12). – P. 2893–8.
20. Cho B., Lim Y., Lee D.Y. et al. Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE // Biochem Biophys Res Commun. – 2002. – 292. – P. 715–26.
21. Cilensek Z.M., Yehiely F., Kular R.K., Deiss L.P. A member of the GAGE family of tumor antigens is anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, interferon- γ , taxol and γ -irradiation // Cancer Biol. Ther. – 2002. – 1. – P. 380–7.
22. Coulie P.G., Van den Eynde B.J., van der Bruggen P. et al. Antigens recognized by T-lymphocytes on human tumours // Biochem Soc Trans. – 1997. – 25(2). – P. 544–8.
23. Ctdatabase. [online]. [Обращение к документу: 01.12.2009]. Доступ через <http://www.cta.lncc.br/>.
24. Dalerba P., Ricci A., Russo V. et al. High homogeneity of MAGE, BAGE, GAGE, tyrosinase and Melan-A/MART-1 gene expression in clusters of multiple simultaneous metastases of human melanoma: implications for protocol design of therapeutic antigen-specific vaccination strategies // Int J Cancer. – 1998. – 77(2). – P. 200–4.
25. De Smet C., Lurquin C., Lethe B. et al. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter // Mol. Cell. Biol. – 1999. – 19. – P. 7237–335.
26. de Wit N.J., Weidle U.H., Ruiter D.J. et al. Expression profiling of MMA-1a and splice variant MMA-1b: new cancer/testis antigens identified in human melanoma // Int J Cancer. – 2002. – 98. – P. 547–53.
27. Dong X.Y., Su Y.R., Qian X.P. et al. Identification of novel CT antigens and their capacity to elicit antibody response in hepatocellular carcinoma patients // Br J Cancer. – 2003. – 89. – P. 291–7.
28. dos Santos N.R., Torensma R., de Vries T.J. et al. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines // Cancer Res. – 2000. – 60(6). – P. 1654–62.
29. Eichmüller S., Usener D., Dummer R. et al. Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens // Proc Natl Acad Sci USA. – 2001. – 98. – P. 629–34.
30. Evans J.P. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization // Bioessays. – 2001. – 23(7). – P. 628–39.
31. Ghafouri-Fard S., Modarressi M.H. Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy // Arch Iran Med. – 2009. – 12(4). – P. 395–404.
32. Gillespie A.M., Coleman R.E. The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy // Cancer Treat Rev. – 1999. – 25(4). – P. 219–27.
33. Goydos J.S., Patel M., Shih W. NY-ESO-1 and CTp11 expression may correlate with stage of progression in melanoma // J Surg Res. – 2001. – 98(2). – P. 76–80.
34. Gure A.O., Chua R., Williamson B. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer // Clin. Cancer Res. – 2005. – 11(22). – P. 8055–62.
35. Gure A.O., Stockert E., Arden K.C. et al. CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis // Int J Cancer. – 2000. – 85. – P. 726–32.

36. Gure A.O., Tureci O., Sahin U. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer // *Int J Cancer*. – 1997. – 72. – P. 965–71.
37. Hofbauer G.F., Schaefer C., Noppen C. et al. MAGE-3 immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution // *Am J Pathol*. – 1997. – 151(6). – P. 1549–53.
38. Hofmann O., Caballero O.L., Stevenson B.J. et al. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2008. – 105(51). – P. 20422–7.
39. Houghton A.N. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma // *Curr Opin Immunol*. – 2001. – 13(2). – P. 134–40.
40. Hunder N.N., Wallen H., Cao J. et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1 // *N Engl J Med*. – 2008. – 358(25). – P. 2698–703.
41. Igney F.H., Krammer P.H. Immune escape of tumors: Apoptosis resistance and tumor counterattack // *J Leukoc Biol*. – 2002. – 71. – P. 907–20.
42. Jassim A., Ollier W., Payne A. et al. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen // *Eur J Immunol*. – 1989. – 19(7). – P. 1215–20.
43. Jungbluth A.A., Busam K.J., Kolb D. et al. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer // *Int J Cancer*. – 2000. – 85(4). – P. 460–5.
44. Jungbluth A.A., Chen Y.T., Busam K.J. et al. CT7 (MAGE-C1) antigen expression in normal and neoplastic tissues // *Int J Cancer*. – 2002. – 99(6). – P. 839–45.
45. Jungbluth A.A., Chen Y.T., Stockert E. et al. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues // *Int J Cancer*. – 2001. – 92(6). – P. 856–60.
46. Keeney S., Giroux C.N., Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family // *Cell*. – 1997. – 88. – P. 375–84.
47. Kirkin A.F., Dzhandzhugazyan K.N., Zeuthen J. Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties // *Cancer Invest*. – 2002. – 20(2). – P. 222–36.
48. Kocher T., Schultz-Thater E., Gudat F. et al. Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product // *Cancer Res*. – 1995. – 55(11). – P. 2236–9.
49. Koslowski M., Tureci O., Bell C. et al. Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer // *Cancer Res*. – 2002. – 62. – P. 6750–5.
50. Kubuschok B., Xie X., Jesnowski R. et al. Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis // *Int J Cancer*. – 2004. – 109. – P. 568–75.
51. Kurashige T., Noguchi Y., Saika T. et al. NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade // *Cancer Res*. – 2001. – 61(12). – P. 4671–4.
52. Landry C., Brasseur F., Spagnoli G.C. et al. Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4 // *Int J Cancer*. – 2000. – 86(6). – P. 835–41.
53. Lee S.Y., Obata Y., Yoshida M. et al. Immunomic analysis of human sarcoma // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2003. – 100. – P. 2651–6.
54. Lehmann F.L.J., Gaulis S., Gruselle O., Brichard V. Clinical Response to the MAGE-A3 Immunotherapeutic in Metastatic Melanoma Patients is associated with a Specific Gene Profile Present Prior to Treatment // XVIth meeting in the Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium Series and the 2008 Meeting of the Cancer Vaccine Consortium. New York City. – 2008. – P. 25.
55. Lethü B., Lucas S., Michaux L. et al. LAGE-1, a new gene with tumor specificity // *Int J Cancer*. – 1998. – 76(6). – P. 903–8.
56. Lim S.H., Wang Z., Chiriva-Internati M., Xue Y. Sperm protein 17 is a novel cancer-testis antigen in multiple myeloma // *Blood*. – 2001. – 97. – P. 1508–10.
57. Lorient A., Boon T., De Smet C. Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia // *Int J Cancer*. – 2003. – 105. – P. 371–6.
58. Lucas S., De Plaen E., Boon T. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression // *Int J Cancer*. – 2000. – 87(1). – P. 55–60.
59. Lucas S., De Smet C., Arden K.C. et al. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis // *Cancer Res*. – 1998. – 58. – P. 743–52.
60. Luo G., Huang S., Xie X. et al. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas // *Cancer Immun*. – 2002. – 2. – P. 11.
61. Lurquin C., De Smet C., Brasseur F. et al. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins // *Genomics*. – 1997. – 46. – P. 397–408.
62. Maio M., Coral S., Sigalotti L. et al. Analysis of cancer/testis antigens in sporadic medullary thyroid carcinoma: expression and humoral response to NY-ESO-1 // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2003. – 88. – P. 748–54.
63. Martelange V., De Smet C., De Plaen E. et al. Identification on a human sarcoma of two new genes with tumor-specific expression // *Cancer Res*. – 2000. – 60. – P. 3848–55.
64. Mintz A., Debinski W. Cancer genetics/epigenetics and the X chromosome: possible new links for malignant glioma pathogenesis and immune-based therapies // *Crit Rev Oncog*. – 2000. – 11(1). – P. 77–95.
65. Monte M., Simonatto M., Peche L.Y. et al. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2006. – 103(30). – P. 11160–5.
66. Moreau-Aubry A., Le Guiner S., Labarriere N. et al. A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma // *J Exp Med*. – 2000. – 191. – P. 1617–24.
67. Nagao T., Higashitsuji H., Nonoguchi K. et al. MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity // *J Biol Chem*. – 2003. – 278. – P. 10668–74.
68. Nicholaou T., Ebert L.M., Davis I.D. et al. Regulatory T-cell-mediated attenuation of T-cell responses to the NY-ESO-1 ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced malignant melanoma // *Clin Cancer Res*. – 2009. – 15(6). – P. 2166–73.
69. Old L.J. Cancer vaccines: an overview // *Cancer Immun*. – 2008. – 8. – Suppl 1. – P. 1.
70. Old L.J. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer // *Cancer Immun*. – 2001. – 1. – P. 1–7.

71. Ono T., Kurashige T., Harada N. *et al.* Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2001. – 98. – P. 3282–7.
72. Peikert T., Specks U., Farver C. *et al.* Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis // *Cancer Res*. – 2006. – 66. – P. 4693–700.
73. Pousette A., Leijonhufvud P., Arver S. *et al.* Presence of synaptonemal complex protein 1 transversal filament-like protein in human primary spermatocytes // *Hum. Reprod*. – 1997. – 12. – P. 2414–7.
74. Rimoldi D., Salvi S., Reed D. *et al.* cDNA and protein characterization of human MAGE-10 // *Int J Cancer*. – 1999. – 82(6). – P. 901–7.
75. Rimoldi D., Salvi S., Schultz-Thater E. *et al.* Anti-MAGE-3 antibody 57B and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family // *Int J Cancer*. – 2000. – 86(5). – P. 749–51.
76. Rosenberg S.A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens // *Immunity*. – 1999. – 10(3). – P. 281–7.
77. Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J. *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome // *Nature*. – 2005. – 434(7031). – P. 325–37.
78. Sahin U., Türeci O., Chen Y.T. *et al.* Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies // *Int J Cancer*. – 1998. – 78(3). – P. 387–9.
79. Scanlan M.J., Altorki N.K., Gure A.O. *et al.* Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9 // *Cancer Lett*. – 2000. – 150. – P. 155–64.
80. Scanlan M.J., Gordon C.M., Williamson B. *et al.* Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis // *Int J Cancer*. – 2002. – 98. – P. 485–92.
81. Schultz-Thater E., Noppen C., Gudat F. *et al.* NY-ESO-1 tumour associated antigen is a cytoplasmic protein detectable by specific monoclonal antibodies in cell lines and clinical specimens // *Br J Cancer*. – 2000. – 83(2). – P. 204–8.
82. Sharma P., Gnjjatic S., Jungbluth A.A. *et al.* Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer // *Cancer Immun*. – 2003. – 3. – P. 19.
83. Sigalotti L., Fratta E., Coral S. *et al.* Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine // *Cancer Res*. – 2004. – 64(24). – P. 9167–71.
84. Silva W.A. Jr, Gnjjatic S., Ritter E. *et al.* PLAC1, a trophoblast-specific cell surface protein, is expressed in a range of human tumors and elicits spontaneous antibody responses // *Cancer Immun*. – 2007. – 7. – P. 18.
85. Simpson A.J., Caballero O.L., Jungbluth A. *et al.* Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer // *Nat Rev Cancer*. – 2005. – 5(8). – P. 615–25.
86. Takimoto M., Wei G., Dosaka-Akita H. *et al.* Frequent expression of new cancer/testis gene D40/AF15q14 in lung cancers of smokers // *Br J Cancer*. – 2002. – 86. – P. 1757–62.
87. Tan K., Shaw A.L., Madsen B. *et al.* Human PLU-1 Has transcription repression properties and interact with the developmental transcription factors BF-1 and PAX-9 // *J. Biol. Chem*. – 2003. – 278. – P. 20507–13.
88. Türeci O., Sahin U., Koslowski M. *et al.* A novel tumour associated leucine zipper protein targeting to sites of gene transcription and splicing // *Oncogene*. – 2002. – 21. – P. 3879–88.
89. Türeci O., Sahin U., Zwick C. *et al.* Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1998. – 95. – P. 5211–6.
90. Van den Eynde B., Brichard V.G. New tumor antigens recognized by T cells // *Curr Opin Immunol*. – 1995. – 7(5). – P. 674–81.
91. Van den Eynde B.J., van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens // *Curr Opin Immunol*. – 1997. – 9. – P. 684–93.
92. van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma // *Science*. – 1991. – 254(5038). – P. 1643–7.
93. Wang R.F., Rosenberg S.A. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes: implications for cancer therapy // *J Leukoc Biol*. – 1996. – 60(3). – P. 296–309.
94. Wang Y., Han K.J., Pang X.W. *et al.* Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies // *J Immunol*. – 2002. – 169. – P. 1102–9.
95. Weber J., Salgaller M., Samid D. *et al.* Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine // *Cancer Res*. – 1994. – 54(7). – P. 1766–71.
96. Yang B., O'Herrin S.M., Wu J. *et al.* MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines // *Cancer Res*. – 2007. – 67(20). – P. 9954–62.
97. Yuan J., Gnjjatic S., Li H. *et al.* CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2008. – 105(51). – P. 20410–5.
98. Yuan L., Shan J., De Risi D. *et al.* Isolation of a novel gene, TSP50, by a hypomethylated DNA fragment in human breast cancer // *Cancer Res*. – 1999. – 59. – P. 3215–21.
99. Yuasa T., Okamoto K., Kawakami T. *et al.* Expression patterns of cancer testis antigens in testicular germ cell tumors and adjacent testicular tissue // *J Urol*. – 2001. – 165. – P. 1790–4.
100. Zendman A.J., Cornelissen I.M., Weidle U.H. *et al.* CTp11, a novel member of the family of human cancer/testis antigens // *Cancer Res*. – 1999. – 59. – P. 6223–9.
101. Zendman A.J., de Wit N.J., van Kraats A.A. *et al.* Expression profile of genes coding for melanoma differentiation antigens and cancer/testis antigens in metastatic lesions of human cutaneous melanoma // *Melanoma Res*. – 2001. – 11(5). – P. 451–9.
102. Zendman A.J., van Kraats A.A., den Hollander A.I. *et al.* Characterization of XAGE-1b, a short major transcript of cancer/testis-associated gene XAGE-1, induced in melanoma metastasis // *Int J Cancer*. – 2002. – 97(2). – P. 195–204.
103. Zendman A.J., Van Kraats A.A., Weidle U.H. *et al.* The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma // *Int J Cancer*. – 2002. – 99. – P. 361–9.

УДК 616-006-085.277.3.015.44

*Е.В. Степанова, М.Е. Абрамов, М.Р. Личиницер***ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ NFκB В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Степанова Евгения Владиславовна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-10-65;**e-mail:** e_stepanova@nm.ru

Статья поступила: 15.09.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Одним из перспективных белков-мишеней для действия таргетной терапии является транскрипционный фактор NFκB, который принимает участие в процессах канцерогенеза, и супрессия которого может привести к подавлению развития опухоли. Белок NFκB регулирует экспрессию различных генов (в том числе и некоторых протоонкогенов), вовлеченных в ингибирование апоптоза, повышение выживаемости клеток и их пролиферативной активности, стимуляцию ангиогенеза и метастазирования. Активация NFκB ассоциируется с резистентностью опухолей к различным химиотерапевтическим агентам и лучевой терапии. Конститутивная экспрессия и/или активация NFκB встречается во многих типах злокачественных опухолей, в том числе при раке молочной железы, легкого, меланоме, лимфомах и других. Высокая эффективность непрямого ингибитора NFκB – бортезомиба, свидетельствует о больших перспективах использования таких препаратов в онкологических диспансерах РФ.

Ключевые слова: онкология, таргетные препараты, NFκB.*E.V. Stepanova, M.E. Abramov, M.R. Lichinicer***NF-κB SIGNALING DISRUPTION: CLINICAL AMPLICATION***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Transcriptional factor NFκB is one of the target proteins involving in cancerogenesis and its suppression could reduce the tumor growth. It was shown long ago that the expression of proteins participating in apoptosis inactivation, increasing the survival and proliferative activity of cancer cells, angiogenesis stimulation and metastasis formation is under the NF-κB transcriptional factor control. It is considered that the NFκB activation correlates with drug radiotherapy resistance. The NFκB activation is a hallmarker of breast cancer, melanoma, lung cancer, lymphomas e.t. The observed high efficacy of bortezomib, NF-κB non-direct inhibitor in clinic, argue the implication of such drugs in cancer patients in Russia.

Key words: oncology, target therapy, NFκB.**Введение**

Заболеваемость злокачественными новообразованиями в последние десятилетия в России непрерывно возрастает и, как показывают статистические расчеты, прирост числа онкологических больных в XXI веке будет постоянно повышаться. По оценкам ВОЗ в РФ смертность от злокачественных новообразований находится на втором месте после смертности от сердечно-сосудистых заболеваний.

Отсутствие тенденции к снижению смертности от онкологических заболеваний требует разработки новых высокоэффективных режимов лечения больных. В настоящее время основными методами лечения рака остаются хирургический, лучевой и химиотерапевтический. Различные виды противоопухолевой терапии с включением различных режимов химиотерапии получают более 70 % всех больных злокачественными новообразованиями. При основных локализациях злокачественных опухолей (рак толстой кишки, легкого, молочной железы) показатель операбельности по отношению к числу заболевших не превышает 20 %, а около 50 % оперированных пациентов умирают в первые два года от прогрессирования заболевания. При этом по данным ВОЗ 40 % смертей от онкологических заболеваний

можно предотвратить использованием современных программ химиотерапии. Однако даже к эффективным химиопрепаратам через несколько курсов лечения возникает лекарственная резистентность. Существует потребность в разработке новых высокоэффективных противоопухолевых препаратов оригинального действия, обладающих низкой токсичностью.

Одним из активно изучаемых белков является NFκB, который принимает участие в процессах канцерогенеза, и супрессия которого может привести к подавлению развития опухоли. В данном обзоре рассматриваются перспективы использования NFκB в качестве мишени для противоопухолевой терапии.

Семейство**транскрипционных факторов Rel/NFκB**

Белок NFκB был открыт в 1986 г. группой исследователей под руководством Дэвида Балтимора (David Baltimore) [2] и был выделен из зрелых В-лимфоцитов как ядерный белок, связанный с энхансерной областью легкой цепи иммуноглобулина каппа, что легло в основу его названия [2; 27]. Изначально его считали транскрипционным фактором, характерным только для В-лимфоцитов, но позже было показано, что он представлен во всех типах клеток [3].

Основная физиологическая функция NFκB заключается в быстром перепрограммировании экспрессии большого набора генов при инфекции, воспалении и некоторых стрессорных воздействиях. Наряду с генами, контролирующими иммунный ответ и деление клеток, NFκB активирует группу генов, продукты которых подавляют апоптоз [1].

Семейство транскрипционных факторов Rel/NFκB состоит из нескольких структурно сходных белков, встречающихся у различных организмов – от насекомых до человека [3].

У позвоночных семейство представлено пятью клеточными белками, подразделяемых на две функциональных группы: первая из них включает c-Rel, RelA (p65) и RelB, а вторая – NFκB-1 (p50/p105) и NFκB-2 (p52/p100). Члены второй группы существуют в виде предшественников – p100 и p105 (с Мм 100 и 105 kDa соответственно).

Все белки семейства Rel/NFκB для осуществления своих функций формируют гомо- и гетеродимеры, в результате получают разнообразные димерные комплексы. Наиболее известный из них – гетеродимер p50/RelA, связанный с ингибиторной субъединицей IκBα. Образование гетеродимеров между p52 и p50 или их гомодимеров приводит к возникновению транскрипционно неактивных ядерных комплексов. Однако при взаимодействии этих димеров с Bcl3 образуются транскрипционно активные тримеры [6]. Представители семейства Rel/NFκB проявляют различную способность к образованию димеров, разное сродство к κB-сайтам и разную способность к связыванию с ингибиторами NFκB [3]. Таким образом, в различных типах клеток могут быть активны разные представители семейства Rel/NFκB, что дает широкие возможности для их регуляции, в том числе для тканеспецифичности [26].

NFκB в развитии и прогрессии опухолей

Транскрипционный фактор NFκB принимает участие в процессах канцерогенеза. Его супрессия может привести к подавлению развития опухоли. Показано, что белок NFκB регулирует экспрессию различных генов (в том числе и некоторых протоонкогенов), вовлеченных в ингибирование апоптоза, повышение выживаемости клеток и их пролиферативной активности, стимуляцию ангиогенеза и метастазирования – основных процессов, участвующих в развитии и прогрессии опухолей [26]. В исследовании разия показано, что активация NFκB ассоциируется с резистентностью опухолей к различным химиотерапевтическим агентам и лучевой терапии. Конститутивная экспрессия и/или активация NFκB встречается во многих типах злокачественных опухолей, в том числе при раке молочной железы, легкого, меланомы, лимфомах и других. Активация NFκB, вызванная гипоксией и понижением pH в опухолевой ткани, характерна не только для опухолевых, но и для окружающих нормальных клеток (т.н. опухолевого микроокружения).

Поэтому неудивительно, что в большинстве клеточных линий опухолей человека независимо от их происхождения – лейкозов или солидных опухолей – NFκB постоянно активирован [8]. В здоровых же клетках подобное явление наблюдается крайне редко. Исключение составляют Т- и В-клетки, тимоциты, моноциты и астроциты на стадии пролиферации. Конститутивно активный NFκB был найден не только в клеточных линиях, но и в образцах тканей опухолей, взятых у пациентов. Еще более важно то, что подавление активности NFκB в этих образцах останавливало пролиферацию и стимулировало апоптоз [5].

Что может вызывать такую конститутивную активацию NFκB в опухолевых клетках, выяснено не полностью. В числе возможных причин называют мутации IκBα, повышенную активность S26-протеасом, гиперэкспрессию провоспалительных цитокинов [21]. Некоторые канцерогены (DMBA, сигаретный дым) и опухолевые промоторы могут вызывать активацию NFκB [4; 13].

Возможные стратегии инактивации NFκB

Существует несколько стратегий инактивации NFκB. Способностью ингибировать NFκB обладают множество веществ – как природных, так и синтетических, которые используют разные механизмы, блокируя различные этапы пути активации NFκB. Но необходимы более детальные исследования, чтобы понять, насколько специфичны эти ингибиторы в отношении опухолевых клеток и будут ли они влиять на другие сигнальные пути. Далее приводятся примеры различных стратегий инактивации NFκB в ответ на один ли более стимулов.

Воздействие на уровне взаимодействия между NFκB и ДНК

Некоторые вещества способны напрямую блокировать взаимодействие NFκB с κB-сайтами на ДНК, что определялось по количеству NFκB, способного связываться с ДНК после добавления ингибитора. Один из способов не дать NFκB связаться с ДНК – ввести в клетку «обманку» (desoxy) для транскрипционных факторов, которая представляет собой двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий последовательность, аналогичную κB-сайтам, и таким образом ингибируют транскрипционно-активные димеры NFκB [12].

Известны другие вещества, препятствующие связыванию NFκB с ДНК, предсердный натрий-уретический пептид, некоторые металлы (например, хром, кадмий, золото, ртуть, цинк), рабаверин, фениловый эфир кофеиновой кислоты, вазоактивный интерстициальный пептид.

Протеасомная деградация ингибиторной субъединицы

Можно воздействовать на пути, по которым происходит ингибирование NFκB в клетке. Протеасомные ингибиторы ингибируют 26S-протеасому, необходимую для деградации IκB.

Таким образом, NFκB не может высвободиться из комплекса с ингибитором и не попадает в ядро [25]. Так действуют пептиды альдегидов – химостатин и леупептин (были разработаны и другие, но они не имели достаточной селективности – ингибировали и сериновые, и цистеиновые протеазы); лактацитин, PS-341 (бортезомиб), ингибитор убиквитин-лигазы, циклоспорин А [11].

Существуют и другие ингибиторы деградации NFκB, но механизм их действия неизвестен: капсацин, белок оболочки вируса гепатита С, глиотоксин грибов, IL-13 и пероксид ванадия.

Фосфорилирование IκB

Поскольку фосфорилирование IκBα является ключевым сигналом для активации NFκB, то вещества, предотвращающие фосфорилирование и, следовательно, последующее убиквитинирование и деградацию IκBα, являются ингибиторами NFκB.

Такими свойствами обладают аспирин, ибупрофен, оксид азота, простагландин А, сангвинарин и YopJ (его синтезирует *Yersinia pseudotuberculosis*) [26].

Недавно было показано, что 4-гидрокси-2-ноненаль, продукт перекисного окисления липидов, предотвращает фосфорилирование IκBα за счет прямого ингибирования IKK [17]. Кроме того, недавно был выделен пептид, который селективно связывает IKKγ и не дает ей войти в холофермент IKK. Этот пептид в ответ на провоспалительные цитокины в системах с мышцами сохраняет уровень активности NFκB на базальном уровне [20]. Тамоксифен и ралоксифен эффективно подавляли фосфорилирование и деградацию IκBα и индуцировали апоптоз в клетках множественной миеломы.

Воздействие на ингибиторные субъединицы

Еще одна стратегия – увеличение количества ингибитора IκBα. Это могут осуществлять β-амилоид, глюкокортикоиды (например, дексаметазон или преднизон), IL-10 и IL-13 [18].

Транспорт NFκB в ядро

Другой подход к подавлению активности NFκB – использование трансмембранных пептидов, которые не дают NFκB переместиться в ядро. Эти пептиды несут участок белка p50, содержащий NLS и конкурентно ингибирующий транспорт настоящих NFκB [19]. Примером могут служить SN-50197 и o,o'-бисмиристоил тиаминдисульфид.

Гликопротеид, выделенный из луковиц растения *Urginea indica*, проявляет проапоптотическое и ангиогенное действие. Это вещество блокирует транспорт NFκB из цитоплазмы в ядро.

Супрессия NFκB за счет трансфекции генов

Наиболее очевидная цель – ген *IκBα*. Для выполнения поставленной задачи необходимо внести модификации в определенные сайты – сайты фосфорилирования (ser32 и 36 заменяют на аланин) и убиквитинирования (lys21 и 22 замещают аргинином), чтобы не допустить их деградации. Такой «супер-репрессор» задерживает NFκB в цитоплазме [7].

Другая цель для внесения генов – HDAC3, деацетилаза гистонов. Этот фермент ацетилюет RelA и помогает ему связываться с IκBα. Экспрессия HDAC3 в клетках культуры HeLa, стимулированных TNF-α, подавляла связывание NFκB с ДНК и понижала уровень RelA с соответствующим повышением количества неактивного комплекса IκBα/NFκB в цитозоле [10]. Этот механизм контролирует длительность активации NFκB и таким образом может быть использован в борьбе его с постоянной активацией.

И, наконец, присутствие различных проапоптотических клеточных белков в цитоплазме подавляет антиапоптотическое действие NFκB. Внесение в клетку гена *Erg1* (транскрипционный фактор, активируемый такими стимулами как NFκB) предотвращает активацию NFκB в системах *in vitro* и *in vivo*. *Erg1* способен образовывать димеры с RelA (p65). Такой димер не способен связываться со своими промоторами на ДНК [9]. Ген *RAI* (*RelA-associated inhibitor*) также кодирует белок, который в конечном итоге связывается с RelA и подавляет антиапоптотическую активность NFκB. 206 Par-4 (*prostate apoptosis response-4*) ингибирует IKK и активирует апоптотический путь через Fas [9]. Кроме того, Par-4 инактивирует Bcl-2, хорошо известный проапоптотический онкоген. Примеры других белков: E2F-1210 (способствует продвижению клетки по клеточному циклу, потеря его экспрессии ведет к развитию многих опухолей), p53 (контролирует клеточный цикл) и циклин E-cdk2 могут подавлять активность NFκB с помощью транскрипционного коактиватора

CRB/p300 [15]. Для того, чтобы NFκB связался с соответствующим участком ДНК, CRB/p300 должен его ацетилировать. p53 и циклин E конкурируют за связывание с комплексом CRB/p300 и препятствуют его связыванию с NFκB. Нужно отметить, что такой антагонизм между NFκB и p53 еще обсуждается, поскольку, например, известно, что p53 способен активировать NFκB [15].

Использование антисмысловых РНК и малых интерферирующих РНК

Антисмысловые РНК, подавляющие экспрессию целевых генов, можно использовать в терапевтических целях. Выделим три стратегии, по которым работают анти-мРНК. **Первая** подразумевает использование одноцепочечных олигонуклеотидов, подавляющих экспрессию РНК. **Вторая** использует каталитически активные олигонуклеотиды – рибозимы – чтобы запустить расщепление ДНК, в **третьей** применяются siRNA [28].

Другие вещества, способные подавлять активность NFκB, но механизм действия которых неизвестен

Различные антиоксиданты тоже могут предотвращать активацию NFκB в ответ на различные стимулы, такие как TNF-α, IL-1, форболовый эфир, LPS, УФ-излучение, за счет неизвестных механизмов [22]. Примеры таких антиоксидантов: дисульфид, куркумин, глутатион и витамин С. Различные препараты также способны ингибировать NFκB. Сюда относятся индометацин, тамоксифен, дексаметазон, салиндак [23].

Токотриенол, разрабатываемый для лечения диабетической нефропатии, заметно понижает количество p65 в ядре. Ксантохумол, флавоноид, выделенный из хмеля (*Humulus lupulus*), способен подавлять активность NFκB в культуре клеток гиперплазии эпителия простаты (BPH-1), но не оказывает никакого действия на клетки РС-3. Теми же свойствами обладает продукт окисления ксантохумола – ксантоауренол – только имеет большую эффективность. Интересно, что при снижении активности NFκB его концентрация в ядре повышается [14].

Бортезомиб (Велкейд) – не прямой ингибитор NFκB – в клинической практике

Бортезомиб – ингибитор протеасомы 26S. Он представляет собой трипептид Pyz-Phe-boroLeu (пуразоновая кислота, фенилаланин и лейцин, несущий борную кислоту вместо карбоксильной группы). Показано, что он подавляет пролиферацию и/или стимулирует апоптоз в различных типах опухолей, включая рак молочной железы, желудка, яичников, поджелудочной железы и др. В настоящее время он одобрен для клинического использования в лечении множественной миеломы. В исследовании SUMMIT было включено 220 пациентов, получивших ранее в среднем 6 программ терапии, 91 % из них были рефрактерны к последней [16].

Этим практически безнадежным пациентам начали терапию бортезомибом. В результате исследования в 70 % случаев произошла стабилизация болезни, у 35 % больных получен объективный ответ. Исследование SUMMIT доказало, что бортезомиб эффективен против клеток множественной миеломы, рефрактерных к существующим методам терапии, и является единственным средством спасения для пациентов с тяжелыми формами рецидивирующей и рефрактерной множественной миеломы.

В исследовании АРЕХ сравнивали эффективность бортезомиба и дексаметазона в терапии множественной миеломы [24]. Через 8 мес. на терапию дексаметазоном 18 % пациентов дали частичные ответы, а 38 % эффективных ответов было получено на терапию бортезомибом. Через 8 мес. наблюдательный комитет остановил исследование ввиду неэтичности его продолжения, и все пациенты из группы дексаметазона были переведены на бортезомиб в силу его очевидной большей эффективности. Через год уровень ответов этих пациентов вырос до 45 %. Ведутся клинические испытания при других злокачественных опухолях.

Бортезомиб – один из самых дорогих препаратов, закупаемых государством, применяется для лечения множественной миеломы. Сейчас единственный в РФ производитель разрешенного к продаже бортезомиба – бельгийско-швейцарская фирма Janssen-Cilag (торговая марка «Велкейд», данные реестра лекарственных средств).

В 2009 г. на приобретение бортезомиба потрачено около 5,2 млрд руб.

Литература

1. Копнин Б.П. Молекулярные механизмы канцерогенеза / Энциклопедия клинической онкологии. Под ред. Давыдова М.И. – М.: РЛС-Пресс, 2004. – С. 34–53.
2. Aggarwal B.B. Nuclear factor- κ B: the enemy within // *Cancer Cell*. – 2004. – 6. – P. 203–8.
3. Ahn K.S., Aggarwal B.B. Transcription factor NF- κ B: a sensor for smoke and stress signals // *Ann N Y Acad Sci*. – 2005. – 1056. – P. 218–33.
4. Anto R.J., Mukhopadhyay A., Shishodia S. et al. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor κ B through phosphorylation and degradation of I κ B(α): correlation with induction of cyclooxygenase-2 // *Carcinogenesis*. – 2002. – 23(9). – P. 1511–8.
5. Bharti A.C., Aggarwal B.B. Nuclear factor- κ B and cancer: its role in prevention and therapy // *Biochem Pharmacol*. – 2002. – 64(5–6). – P. 883–8.
6. Bours V., Franzoso G., Azarenko V. et al. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through κ B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers // *Cell*. – 1993. – 72. – P. 729–39.
7. Bours V. Stable inhibition of nuclear factor κ B in cancer cells does not increase sensitivity to cytotoxic drugs // *Cancer Res*. – 1999. – 59. – P. 811–5.
8. Carg A., Aggarwal B.B. Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development // *Leukemia*. – 2002. – 16. – P. 1053–68.
9. Chapman N.R., Perkins N.D. Inhibition of the RelA(p65) NF- κ B subunit by Egr-1 // *J Biol Chem*. – 2000. – 275. – P. 4719–25.
10. Chen L.F., Fischle W., Verdin E., Greene W.C. Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation // *Science*. – 2001. – 293. – P. 1653–7.
11. Cusack J.C. Jr, Liu R., Houston M. et al. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor- κ B inhibition // *Cancer Res*. – 2001. – 61. – P. 3535–40.
12. D'Acquisto F., Ialenti A., Ianaro A. et al. Local administration of transcription factor decoy oligonucleotides to nuclear factor- κ B prevents carrageenin-induced inflammation in rat hind paw // *Gene Ther*. – 2000. – 7. – P. 1731–7.
13. Dong G., Chen Z., Kato T., Van Waes C. The host environment promotes the constitutive activation of nuclear factor- κ B ... // *Cancer Res*. – 1999. – 59. – P. 3495–504.
14. Emily C. Colgate, Cristobal L. Miranda, Jan F. Stevens et al. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF- κ B activation in prostate epithelial cells // *Cancer Letters*. – 2007. – 246. – P. 201–9.
15. Ikeda A., Sun X., Li Y. et al. p300/CBP-dependent and -independent transcriptional interference between NF- κ B RelA and p53 // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2000. – 272. – P. 375–9.
16. Jagannath S. SUMMIT/CREST Investigators. Bortezomib in combination with dexamethasone for the treatment of patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma with less than optimal response to Bortezomib alone // *Haematologia*. – 2006. – 91. – P. 929–34.
17. Ji C., Kozak K.R., Marrett L.J. I κ B kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal // *J Biol Chem*. – 2001. – 276. – P. 18223–8.
18. Lentsch A.B., Shanley T.P., Sarma V., Ward P.A. In vivo suppression of NF- κ B and preservation of I κ B α by interleukin-10 and interleukin-13 // *J Clin Invest*. – 1997. – 100. – P. 2443–8.
19. Lin Y.Z., Yao S.Y., Veach R.A., Torgerson T.R., Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B... // *J Biol Chem*. – 1995. – 270. – P. 14255–8.
20. May M.J., D'Acquisto F., Madge L.A. et al. Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex // *Science*. – 2000. – 289. – P. 1550–4.
21. O'Connell M.A., Cleere R., Long A. et al. Cellular proliferation and activation of NF κ B are induced by autocrine production of tumor necrosis factor α in the human T lymphoma line HuT 78 // *J Biol Chem*. – 1995. – 270(13). – P. 7399–404.
22. Pahl H.L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors // *Oncogene*. – 1999. – 18. – P. 6853–66.
23. Palombella V.J., Rando O.J., Goldberg A.L., Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B // *Cell*. – 1994. – 78. – P. 773–85.
24. Richardson P.G. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final-to-evant results of the APEX trial // *Blood*. – 2007. – 110. – P. 3557–60.
25. Russo S.M., Tepper J.E., Baldwin A.S. Jr. et al. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF- κ B // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. – 2001. – 50. – P. 183–93.
26. Sethi G., Sung B., Aggarwal B.B. Nuclear Factor- κ B Activation: From Bench to Bedside // *Exp Biol Med*. – 2008. – 233(1). – P. 21–31.
27. Shishodia S., Aggarwal B.B. Nuclear factor- κ B activation mediates cellular transformation, proliferation, invasion angiogenesis and metastasis of cancer // *Cancer Treat Res*. – 2004. – 119. – P. 139–73.
28. Surabhi R.M., Gaynor R.B. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency 1 replication // *J Virol*. – 2002. – 76. – P. 12963–73.

Заключение

Таким образом, белки семейства NF κ B могут рассматриваться в качестве мишени для разработки препаратов направленного действия.

Они активно задействованы в развитии и прогрессии опухолей, конститутивно активированы во многих типах опухолей и ассоциированы с неблагоприятным прогнозом течения болезни.

Становится понятно, что лекарственные препараты должны подавлять активность NF κ B не полностью, но с высокой селективностью.

Требуется дальнейшее исследование и поиск высокоселективных ингибиторов данного семейства, обладающих высокой специфичностью против опухолевого действия и низкой токсичностью, которые будут широко востребованы в онкологических диспансерах РФ.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (государственный контракт 02.512.12.2035).

УДК 616-006.66-033.2:615.277.3(048.8)

*С.В. Зинченко², А.Н. Рудык¹, Р.Ш. Хасанов¹***ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАЗАМИ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ РАКА И АДЕНОКАРЦИНОМЫ БЕЗ ВЫЯВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА**¹Приволжский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Казань²Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ, Казань**Контактная информация:***Сергей Викторович Зинченко, к.м.н., врач-онколог отделения опухолей головы и шеи***адрес:** 420029, Казань, Сибирский тракт, 29; **тел.** +7(843)519-27-40;**e-mail:** zinchenkos.v@mail.ru

Статья поступила: 16.03.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Цель исследования – необходимость изучить результаты лечения больных с метастазами низкодифференцированных раков и аденокарцином без выявленного первичного очага, а также сравнить эффективность и токсичность существующих схем полихимиотерапии за последние 10 лет. Анализ литературных данных показал, что наиболее эффективными препаратами в лечении данных больных является комбинация препараты платины + этопозид. Достигнут порог в выживаемости данной категории пациентов, составляющий в среднем 9–11 мес. Прорыв в лечении пациентов с метастазами без выявленного первичного очага может быть достигнут либо поиском принципиально новых химиопрепаратов, либо эмпирической идентификацией наиболее вероятного первичного очага и назначением таргетной терапии.

Ключевые слова: метастазы без выявленного первичного очага, аденокарцинома, полихимиотерапия.*S.V. Zinchenko, A.N. Rudykh, R.Sh. Khasanov***TREATMENT OF PATIENTS WITH METASTATIC LOW DIFFERENTIATED CARCINOMA AND ADENOCARCINOMA WITHOUT PRIMARY LESION IDENTIFICATION**¹Privolzhsky Branch of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Kazan²Cancer Research Clinic of Tatarstan Republic, Kazan**Abstract**

The aim of this review was to study the results of treatment of patients with metastatic low differentiated carcinoma and adenocarcinoma without primary lesion identification and to evaluate the efficacy and toxicity of poly chemotherapy lately 10 years. The literature data indicate that the most effective treatment was the combination of cisplatin and etoposide. Such treatment increases the survival of patients up to 9-11 months. Here, we discuss the recent data accumulated on this question and conclude that the most effective treatment should be based on search of new anticancer drugs or on identification of primary lesion and target therapy of this lesion.

Key words: metastasis without identification of primary lesion, adenocarcinoma, polychemotherapy.

Проблема лечения больных с метастазами без выявленного первичного очага, на долю которых приходится около 3–6 % [24; 26; 33] пациентов с впервые зарегистрированным диагнозом злокачественного новообразования является весьма актуальной и не решенной на сегодняшний день. Несмотря на то, что показатели заболеваемости данной категории пациентов входят в первую десятку самых распространенных злокачественных образований [3; 26], отношение к ним большинства онкологов остается неоднозначным. Отсутствие приемлемой классификации, сложности диагностики и тем более – лечения пациентов с метастазами злокачественных опухолей без выявленного первичного очага, а также неудовлетворительные результаты специальной терапии вызывают у значительной части специалистов пессимизм в отношении данной группы больных. Внедрение в клиническую практику компьютерной и магнитно-резонансной томографии, позитронной эмиссионной томографии [20; 22], методов иммунодиагностики значительно улучшили показатели обнаружения первичной опухоли, но проблема остается не решенной.

Кроме того, пациенты данной категории крайне разнородны по локализации распространенности и морфологической принадлежности мета-

стазов. Таким образом, возможности сравнения чувствительности и точности диагностических мероприятий, эффективности лечения больных с метастазами без выявленного первичного очага крайне недостоверны. Не менее важным остается вопрос об экономической эффективности диагностики и лечения больных с метастазами без выявленного первичного очага. Не секрет, что затраты на обследование и возможное дальнейшее лечение этих пациентов остаются наиболее высокими, однако их назначение и выполнение зачастую является необоснованным или даже ненужным.

Bugat R. et al. [8] в рамках целевой программы под руководством Федерации центров рака Франции в отношении пациентов с метастазами без выявленного первичного очага предложили следующие категории больных, подлежащих лечению:

- 1) низкодифференцированный нейроэндокринный рак – по схеме EP;
- 2) метастазы плоскоклеточного рака в лимфоузлы шеи – лимфодиссекция и/или лучевая терапия;
- 3) метастазы аденокарциномы в подмышечные лимфоузлы у женщин – терапия как при РМЖ N⁺ (не рекомендуется облучение молочной железы);

- 4) первичный сосочковый серозный рак брюшины у женщин – терапия как при раке яичника.

Все остальные группы пациентов, по мнению 81 независимого рецензента, поддержавших данные рекомендации, подлежат паллиативной химиотерапии в зависимости от состояния больных на момент установления диагноза.

В то время как в отношении указанных выше видов опухолей, на долю которых приходится около 15 % всех пациентов с CUP-синдромом, сформировалась определенная тактика, не разработанными остаются методы воздействия на основную группу пациентов с не определенным анатомо-морфологическим потенциалом опухоли.

До конца не определены схемы оптимальной химиотерапии для пациентов с метастатическим поражением в зависимости от морфологической принадлежности опухоли.

Отсутствуют достоверные критерии и факторы прогнозирования, на основании которых может быть решен вопрос о необходимости и эффективности специального лечения.

Цель нашего обзора – сравнить эффективность существующих схем лечения больных с метастазами низкодифференцированного рака и аденокарциномы без выявленного первичного очага, не относящихся к указанным категориям (85 %) [8]. Группа греческих ученых University of Ioannina Hospital во главе с DP N. Pavlidis анализируя ранее проведенные исследования, приводит следующие данные (табл. 1). Представленные данные отображают эффективность применения препаратов платины, при этом усредненные показатели медианы выживаемости не превышают 8,8 мес.

Мы провели анализ литературы по эффективности лечения больных с метастазами низкодифференцированного рака и аденокарциномы за последние 8 лет (табл. 2).

Таблица 1

Проспективные исследования полихимиотерапии пациентов с метастазами без первичного очага, основанной на препаратах платины [25]

Автор/год	Схемы ПХТ	Количество пациентов	Ответ на лечение, %	Выживаемость (медиана, мес.)
Jadeja et al., 1983	FACP	23	17	6
Greco et al., 1986	PVeB	56	57	16 ^a
Milliken et al., 1987	PVeB	50	39	5
Becouarn et al., 1989	FAPH	85	21	6
Van der Gaast et al., 1990	PEB	34	79	8 ^{+a}
Raber et al., 1991	FEP	36	22	11
Lenzi et al., 1991	PFL	25	32	–
Gill et al., 1991	PE	16	19	8
Wagener et al., 1991	P	21	19	5
Falkson and Cohen, 1998	PMiEp	40	50	9,4
Warner et al., 1998	CbE	26	23	5,6
Briasoulis et al., 1998	CbEbE	62	37	10
Lofts et al., 1999	PF	44	27	–
Voog et al., 2000	PE	23	32	8
Saghatchian et al., 2001	PE–BI PFIf	30 18	40 44	9,4 16,1*
Lortholary et al., 2002	PG PIr	80	42 25	22%** 23%**

* низкодифференцированный рак (PDC); ** одногодичная выживаемость.

A – адриамицин; B – блеомицин; C – циклофосфан; Cb – карбоплатин; E – этопозид; Ep – эпирубицин; F – фтороурацил; G – гемцитабин; H – гексаметиламин; L – лейковорин; Mi – митомицин C; I – ифосфамид; If – интерферон-α; Ir – иринотекан; P – цисплатин; Ve – винбластин; Pt – паклитаксел; Dt – доцетаксел.

Таблица 2

Сравнительная характеристика различных схем лечения больных с метастазами низкодифференцированных рака и аденокарциномы без выявленного первичного очага

Авторы/Год	Схемы ПХТ	Количество пациентов	Ответ на терапию	Выживаемость (медиана, мес.)	Токсичность
Voog E. et al., 2000 [34]	PE	25	32 %	8	–
Briasoulis E. et al., 2000 [7]	CbPt	77	38,7 %	13	–
Greco F.A. et al., 2000 [17]	CbPtE	71	63 %	11	0%
Greco F.A. et al., 2001 [15]	CbPtE PDt CbDt	144	36 %	10	–
Dowell et al., 2001 [12]	PtFL CbE	7 10	19%	8,1 6,3 (P=0,91)	0 % 29 %
Guardiola E. et al., 2001 [17]	CAP	22	50 %	10,7	14
Karapetis et al., 2001 [19]	PEEp	36	22 %	9,0	–
Macdonald et al., 2002 [22]	PMiF	31	27	7,7	–
Culine S. et al., 2002 [13]	AC EP	62 20	39% 45%	10	2,4 %
Song S.Y. et al., 2002 [32]	6 курсов с P	81	25,7 %	5,6	–
Culine S. et al., 2003 [11]	PG Иринотекан+P	38 40	55 % 38 %	8 6	18 % 20 %
Greco F.A. et al., 2002 [10]	CbGPt	120	25	9	–
Munoz A. et al., 2004 [23]	ECbPt	48	15 (31 %)	7,4	–
Pouessel D. et al., 2004 [28]	GDt	35	14	10	–
Schneider B.J. et al., 2007 [31]	CbG	33	39,4 %	7,6	67 %
Pentherodakis G. et al., 2008 [27]	CbDt	47*	46%** 17%***	22,6 5,3	26 %

* все пациенты с аденокарциномой и низкодифференцированным раком ECOG 0-2;

** пациенты с невнутренностными метастазами и немучиозной перитонеальной аденокарциномой (благоприятный прогноз);

*** с метастазами во внутренние органы (неблагоприятный прогноз).

Сравнивая данные, представленные в таблицах, следует отметить, что средний прирост медианы выживаемости больных с метастазами низкодифференцированных рака и аденокарциномы 2000–2008 гг. (9,1) в сравнении с 1983–1990 гг. составил 0,3 мес. (p=0,27). При этом годовая выживаемость остается в пределах 35–40 %. Объяснить такой статистически незначимый прирост следует за счет внедрения в широкую клиническую практику препаратов платины и этопозида, которые, доминируя с конца XX в., остаются основой полихимиотерапии у данной категории пациентов и в настоящее время.

Несмотря на некоторый прогресс, достигнутый в лечении больных с метастазами без выявленного первичного очага, средняя совокупная выживаемость в целом не превышает 9–11 мес.

Так, Giard R.W. et al. [13] считают, что нет необходимости в подобном пристальном внимании к этой категории пациентов, 85% которых не переживает и 1 года.

Попытка увеличения доз химиопрепаратов с целью повышения выживаемости больных с метастазами без выявленного первичного очага, как сообщают Saad E.D. et al [29], в результате проведенного широкомасштабного исследования в США и Европе не увенчались успехом. При значительном увеличении токсичности с ростом дозировок ожидаемого прироста продолжительности жизни не происходит. Вероятнее всего, прорыва в лечении данной патологии можно добиться путем поиска новых препаратов, основанных на более глубоком ультраструктурном понимании природы самого феномена проявления метастазов при «молчащей» первичной опухоли.

Saghatchian M. et al. [30] изучили эффективность химиотерапии в зависимости от дифференцировки метастазов. 30 пациентов (группа А) с низко-

дифференцированной аденокарциномой получали схему EP, 18 больных (группа В) с высоко и умеренно дифференцированным раком получили PF+а-интерферон. Средняя продолжительность жизни в группе А составила 9,4 мес. (5–13,7 мес.), в группе В – 16,1 (11,8–20,3 мес.) при сопоставимой токсичности. Таким образом, установившееся мнение о плохой химиочувствительности умеренно и высокодифференцированной аденокарциномы было подвергнуто сомнению.

Culine S. et al. [9], на примере 25 пациентов, получивших ранее химиотерапию с платиной, показали, что назначение ХТ 2 линии 5-ФУ+лейковорин не увеличивает выживаемость больных с метастазами без выявленного первичного очага. Средняя продолжительность жизни с момента установления диагноза составила 9 мес. Более эффективным препаратом второй линии, как указали Hainsworth J.D. et al [18] на примере 39 больных, является гемцитабин, который в дозе 1000 мг/м² в 1; 8 и 15 дни 28-дневного курса увеличивает безрецидивный период на 5 мес. При этом выраженных токсических реакций отмечено не было.

Не менее актуальна проблема диагностики и лечения больных с метастазами без выявленного первичного очага в России. Крайняя разнородность групп, исключающая возможность достоверного статистического анализа, малый интерес онкологов к перспективной категории больных привели к недостаточному освещению данной тематики в отечественной литературе. Отсутствуют рандомизированные и проспективные исследования. Анализируя данные отечественных авторов [1–6], годовая выживаемость пациентов с метастазами низкодифференцированных рака и аденокарциномы не превышает 27,0±9,2 %, 2 года переживают от 3,6±4,7 % до 15,1±7,2 %, 5 лет – 13,2 %. Средняя продолжительность жизни составляет 8,4–16 мес.

При этом режимы химиолучевой терапии не учитывались. Современные отечественные публикации, к сожалению, носят эпизодический характер.

Анализируя информацию, представленную выше, можно заключить:

- 1) К настоящему времени не достигнут прогресс в лечении больных метастазами низкодифференцированного рака и аденокарциномы. Прирост медианы выживаемости больных с метастазами низкодифференцированных рака и аденокарциномы на 2008 г. в сравнении с 1983–1990 гг. составил 0,3 мес. ($p=0,27$).

- 2) Наиболее эффективны комбинации платины и этопозиды: токсичность контролируема и низкой в сравнении с другими комбинациями. Изучается роль таксанов.

- 3) Достигнуто определенное плато в медиане выживаемости данной категории пациентов, составляющее в 9–11 мес.

Прорыв в лечении пациентов с метастазами без выявленного первичного очага может быть достигнут либо поиском принципиально новых химиопрепаратов, либо эмпирической идентификацией наиболее вероятно первичного очага и соответственно назначением терапии наиболее эффективной при данном виде опухоли.

Литература

1. Гаврилко М.А. Оптимизация методов диагностики и лечения больных с метастазами рака из невыявленного первичного очага: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1998. – 25 с.
2. Гафур-Ахунов Мирза-Али. Метастазы злокачественных опухолей в лимфатические узлы без выявленного первичного очага. (Клиника, диагностика и лечение): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1992. – 51 с.
3. Комаров И.Г., Комов Д.В. Метастазы злокачественных опухолей без выявленного первичного очага. – М.: «Трида-Х», 2002. – 136 с.
4. Подрегульский К.Э. Современные подходы к комплексному обследованию и лечению больных с метастазами рака из невыявленного первичного очага: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1992. – 21 с.
5. Чевардов Н.И., Иванова Н.К., Дмитриев В.П., Бельских В.М. Метастазы злокачественных опухолей без выявленного первичного очага // Врач-аспирант. – 2006. – Т. 10, №6. – С. 32–7.
6. Шайдаров И.В. Оптимизация клинко-морфологических критериев диагностики и лечения больных с метастатическим раком без выявленного первичного очага: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 2004. – 26 с.
7. Briasoulis E., Kalofonos H., Bafaloukos D. et al. Carboplatin plus paclitaxel in unknown primary carcinoma: a phase II Hellenic Cooperative Oncology Group Study // J Clin Oncol. – 2000. – 18(17). – P. 3101–7.
8. Bugat R., Bataillard A., Lesimple T. et al. Standards, Options and Recommendations for the management of patient with carcinoma of unknown primary site // Bull Cancer. – 2002. – 89(10). – P. 869–75.
9. Culine S., Ychou M., Fabbro M. et al. 5- fluorouracil and leucovorin as second-line chemotherapy in carcinomas of unknown primary site // Anticancer Res. – 2001. – 21(2B). – P. 1455–7.
10. Culine S., Fabbro M. et al. Alternative bimonthly cycles of doxorubicin, cyclophosphamide, and etoposide, cisplatin with hematopoietic growth factor support in patients with carcinoma of unknown primary site//Cancer. – 2002. – 94(3). – P. 840–6.
11. Culine S., Lortholary A., Voigt J.J. et al. Cisplatin in combination with either gemcitabine or irinotecan in carcinomas of unknown primary site: results of a randomized phase II study – trial for the French Study Group on Carcinomas of Unknown Primary (GEFCAP1 01) // J Clin Oncol. – 2003. – 21(18). – P. 3479–82.
12. Dowell J.E., Garrett A.M., Shyr Y. et al. A randomized Phase II trial in patients with carcinoma of an unknown primary site // Cancer. – 2001. – 91(3). – P. 592–7.
13. Giard R.W. Metastasis of an unknown primary tumor, management attuned to histopathology // Ned Tijdschr Geneesk. – 2002. – 146(36). – P. 1681–5.
14. Greco F.A., Burris H.A., Erland J.B. et al. Carcinoma of unknown primary site // Cancer. – 2000. – 89(15). – P. 2655–60.
15. Greco F.A., Gray J., Burris H.A. et al. Taxane-based chemotherapy for patients with carcinoma of unknown primary site // Cancer J. – 2001. – 7(3). – P. 203–12.
16. Greco F.A., Burris H.A., Litchy S. et al. Gemcitabine, carboplatin, and paclitaxel for patients with carcinoma of unknown primary site: a Minnie Pearl Cancer Research Network study // J Clin Oncol. – 2002. – 20(6). – P. 1651–6.
17. Guardiola E., Pivot X., Tchicknavorian X. et al. Combination of cisplatin-doxorubicin-cyclophosphamide in adenocarcinoma of unknown primary site: a phase II trial // Am J Clin Oncol. – 2001. – 24(4). – P. 372–5.
18. Hainsworth J.D., Burris H.A., Calvert S.W. et al. Gemcitabine in the second-line therapy of patients with carcinoma of unknown primary site: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network // Cancer Invest. – 2001. – 19(4). – P. 335–9.
19. Karapetis C.S., Yip D., Virik K. et al. Epirubicin, cisplatin, and prolonged or brief infusional 5-fluorouracil in the treatment of carcinoma of unknown primary site // Med Oncol. – 2001. – 18(1). – P. 23–32.
20. Kaufmann O., Fietze E., Mengers J., Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas // Am J Clin Pathol. – 2001. – 116(6). – P. 823–30.
21. Macdonald A.G., Nicolson M.C. et al. A phase II study of mitomycin C, cisplatin and continuous infusion 5-fluorouracil (MCF) in the treatment of patients with carcinoma of unknown primary site//Br J Cancer. – 2002. – 86(8). – P. 1238–42.
22. Mantaka P., Baum R.P. et al. PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) in patients with cancer of unknown primary (CUP): influence on patients diagnostic and therapeutic management//Cancer Biother Radiopharm. – 2003. – 18(1). – P. 47–58.
23. Munoz A., Fuente N., Barcelo R. et al. Prognostic and predictive factors of patients with cancer of unknown origin treated with a paclitaxel-based chemotherapy // Med Clin Barc. – 2004. – 122(6). – P. 216–8.
24. Pavlidis N., Briasoulis E., Hainsworth J., Greco F.A. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary // European Journal Cancer. – 2003. – 39(14). – P. 1990–2005.
25. Pavlidis N. Cancer of unknown primary: biological and clinical characteristics//Annals of oncology. – 2003. – 14(3). – P. 11–8.
26. Penel N. Diagnostic management of inoperable metastases // Presse Med. – 2003. – 32(21). – P. 990–1004.
27. Pentheroudakis G., Briasoulis E., Kalofonos H. et al. Hellenic Cooperative Oncology Group. Docetaxel and carboplatin combination chemotherapy as outpatient palliative therapy in carcinoma of unknown primary: a multicenter Hellenic Cooperative Oncology Group phase II study // ActaOncol. – 2008. – 47(6). – P. 1148–55.
28. Pouessel D., Culine S., Becht C. et al. Gemcitabine and docetaxel as front-line chemotherapy in patients with carcinoma of an unknown primary site // Cancer. – 2004. – 100(6). – P. 1257–61.
29. Saad E.D., Abbruzzese J.L. Prognostic stratification in UPC: a role for assessing the value of conventional-dose and high-dose chemotherapy for unknown primary carcinoma // Crit Rev Oncol Hematol. – 2002. – 41(2). – P. 205–11.
30. Saghatchian M., Fizazi K., Borel C. et al. Carcinoma of an unknown primary site: a chemotherapy strategy based on histological differentiation – results of a prospective study // Ann Oncol. – 2001. – 12(4). – P. 535–40.
31. Schneider B.J., El-Rayes B., Muler J.H. et al. Phase II study trial of carboplatin, gemcitabine, and capecitabine in patients with carcinoma of unknown primary site // Cancer. – 2007. – 110(4). – P. 770–5.
32. Song S.Y., Kim W.S. et al. Adenocarcinoma of unknown primary site//Korean J Intern Med. – 2002. – 17(4). – P. 234–9.
33. van de Wouw A.J., Jansen R.L., Speel E.J., Hillen H.F. The unknown biology of the unknown primary tumour: a literature review // Annals of Oncology. – 2003. – 14(2). – P. 191–6.
34. Voog E., Merrouche Y., Trillet-Lenoir V. et al. Multicentric phase II study of cisplatin and etoposide in patients with metastatic carcinoma of unknown primary // Am J Clin Oncol. – 2000. – 23(6). – P. 614–6.

УДК 616.345/.351-006.6:615.277.3

Т.А. Якушева¹, Л.М. Когония², А.Ю. Федотов³, И.М. Гришина⁴, А.Н. Северцев⁵, Э.Т. Байрамов¹**АВАСТИН В ЛЕЧЕНИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**¹Городская поликлиника №150, онкологическое отделение, Москва²ФУВ МОНИКИ им В.Ф. Владимирского, Москва³Онкологический диспансер №2 САО, Москвы⁴Городская поликлиника № 52 ЮАО, Москвы⁵НУЗ «Центральная клиническая больница №1» ОАО «Российские железные дороги», Москва**Контактная информация:**

Якушева Татьяна Александровна, врач-онколог онкологического диспансерного отделения

адрес: 119421, Москва, ул. Новаторов, д. 5; **тел.** +7(495)432-90-10;**e-mail:** irinashubina@mail.ru

Статья поступила: 16.09.2010, принята к печати 29.09.2010.

Резюме

Арсенал лекарственных средств для лечения метастатического колоректального рака существенно расширился с внедрением в практику препаратов таргетной терапии, включающих Авастин (Бевацизумаб) – химерное человеческое рекомбинантное антитело против VEGF, которое является первым антиангиогенным препаратом, доказавшим свою эффективность. Добавление Авастина к химиотерапии (оксалиплатин, иринотекан, др.) позволяет значительно увеличить продолжительность жизни (общую и до начала прогрессирования процесса) у пациентов с КРР, получающих первую или вторую линию химиотерапии, что подтверждается результатами большинства рандомизированных контролируемых исследований.

Ключевые слова: таргетная терапия, колоректальный рак, авастин.Т.А. Yakusheva¹, L.M. Kogonia², A.Yu. Fedotov³, P.M. Grishina⁴, A.N. Severtsev⁵, E.T. Bajramov¹**THE EFFECT OF AVASTIN IN TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER**¹City out-patient hospital №150, oncological department, Moscow²FUV MONIKI named after V.F. Vladimirsky, Moscow³Oncological dispensary №2 NAD of Moscow⁴City out-patient hospital № 52 SAD of Moscow⁵NUZ «Central clinical hospital №1» JSC «Russian railways», Moscow**Abstract**

The drug armamentarium for treatment of metastatic colorectal cancer has been extended with the introduction of target therapy including Avastin (Bevacizumab), chimeric monoclonal humanized antibody raised against VEGF. Avastin is the first effective anti-angiogenic drug. The combination of chemotherapy (Oxaliplatin, Irinotecan etc.) with Avastin increases the survival of patients with colorectal cancer undergone to I or II line of chemotherapy. This was documented by the results of controlled randomized clinical trials.

Key words: target therapy, colorectal cancer, Avastin.**Введение**

Рак толстой кишки – одна из наиболее распространенных злокачественных опухолей, заболеваемость которой возрастает с каждым годом. В структуре онкологической заболеваемости в мире КРР занимает 4 место. По оценке ВОЗ в мире около 1 000 000 человек ежегодно заболевают КРР, который является причиной смерти приблизительно половины из них [1; 5]. Долгое время практически единственным препаратом для лечения распространенного колоректального рака был 5-фторурацил (5-ФУ). Однако результаты его применения были неудовлетворительными: общая выживаемость больных редко превышала 12 мес., а общая эффективность лечения составляла 15–20% (при использовании длительных инфузий) с сохранением эффекта 3–5 мес.

За последние 20 лет в области лекарственного лечения рака были сделаны большие успехи. Появление новых препаратов наряду с развитием хирургии и интервенционной радиологии позволило улучшить результаты лечения метастатического КРР [2; 4].

Радикальное удаление опухоли – первая важнейшая задача любого хирургического вмешательства

ва. К сожалению, даже после радикальных операций не менее 50 % пациентов погибают в различные сроки вследствие появления отдаленных метастазов, что позволяет делать вывод о наличии системного заболевания на момент хирургического лечения. Наиболее высокий риск возникновения отдаленных метастазов существует у пациентов с наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (III стадия) и прорастании опухоли в прилежащую жировую клетчатку или соседние органы (II стадия), а также при наличии ряда других прогностически неблагоприятных факторов. Так, неблагоприятный прогноз имеют пациенты с отдаленными метастазами, опухолью больших размеров, выраженной анемией, высокими уровнями ЛДГ и РЭА. Наличие таких осложнений, как обструкция кишечника или перфорация, также негативно влияет на выживаемость больных.

Этой категории пациентов хирургическое лечение необходимо дополнять адъювантной терапией (уничтожение микрометастазов с целью предупреждения рецидива заболевания). Современные методы диагностики позволяют повысить точность дооперационного стадирования опухолевого процесса и тем самым оптимизировать лечение.

Химиотерапия считается неотъемлемой частью комбинированного и комплексного лечения II–IV стадий КРР. Более чем у 70 % больных раком толстой кишки на различных этапах лечения с адъювантной или паллиативной целью применяется химиотерапия [2; 3].

Значительно расширился арсенал лекарственных средств, применяемых для лечения метастатических форм колоректального рака, связанный как с появлением новых лекарств традиционной химиотерапии, так и с внедрением в практику таргетных препаратов.

Таргетная терапия

Внедрение в клиническую практику препаратов направленного действия (таргетных) меняет не только традиционно применяемую методику клинического изучения лекарственных средств, но, что особенно важно, и всю стратегию лечения в онкологии. Новая стратегия лечения – антиангиогенная терапия – направлена на блокирование роста новых сосудов в опухоли. Ангиогенная активность обусловлена балансом между ангиогенными стимуляторами и природными ингибиторами ангиогенеза. В опухолях находят повышенный уровень стимуляторов ангиогенеза (VEGF, тимидин фосфорилаза, ангиогенин и др.), тогда как уровень эндогенных ингибиторов (тромбоспондин, ангиостатин, эндостатин и др.) снижен. Введение VEGF приводит к запуску процессов неоваскуляризации, образованию незрелых, высокопроницаемых и нестабильных сосудов [4; 7; 17]. Ингибиторы ангиогенеза действуют непосредственно на эндотелиальные клетки, блокируя их пролиферацию, миграцию и индуцируя апоптоз в активированных эндотелиальных клетках.

Авастин (Бевацизумаб) – химерное человеческое рекомбинантное антитело против VEGF. Он является первым антиангиогенным препаратом, доказавшим свою эффективность [4; 8; 9; 12; 20].

Таргетная терапия Авестином в лечении колоректального рака

В настоящее время большие надежды связаны с комбинациями химиопрепаратов и препаратов направленного действия

Среди различных факторов стимулирующих рост сосудов, VEGF считается наиболее благоприятной мишенью таргетной терапии, направленной на подавление неоваскуляризации при колоректальном раке. VEGF экспрессируется приблизительно в 50 % случаев КРР. Показана также высокая плотность микрососудов в опухоли, что имеет несомненное прогностическое значение с точки зрения общей выживаемости.

Одним из первых исследований бевацизумаба при распространенном колоректальном раке было исследование F. Kabbinavar et al. [12], включавшее в себя результаты лечения 104 больных с диссеминированным процессом, рандомизированных на 3 группы:

- 1) 5-фторурацил + Лейковорин в еженедельном режиме,
- 2) тот же режим + бевацизумаб 10 мг/кг,
- 3) тот же режим + бевацизумаб 5 мг/кг. Результаты представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, было предложено 2 режима с добавлением бевацизумаба – в дозе 5 мг/кг и 10 мг/кг, при этом дозировка 5 мг/кг оказалась более эффективной. Даже при использовании не самого оптимального режима современной химиотерапии, были получены впечатляющие результаты

в отношении значимого удвоения времени до прогрессирования и общей выживаемости.

Кроме того, у 2 из 22 больных, которым было продолжено лечение бевацизумабом в монотерапии после прогрессирования, наблюдалась частичная ремиссия и у 7 больных достигнута длительная стабилизация [12].

H. Hurwitz et al. [11] опубликовали в 2004 г. результаты исследования I линии лечения колоректального рака у 813 больных, получавших IFL (иринотекан 125 мг/м² + 5-ФУ 500 мг/м² болюс + ЛВ 20 мг/м² болюс еженедельно в течение 4 недель, с перерывом 2 недели) с бевацизумабом или без него, в котором показали хорошую переносимость МКА и отсутствие какого-либо усиления нежелательных явлений при добавлении бевацизумаба в используемую схему химиотерапии.

В III фазе исследований, результаты которых были опубликованы B. Giantonio et al. [9], 822 пациента получали высокие дозы бевацизумаба (10 мг/кг, внутривенно, каждые 2 недели в монорежиме), комбинацию FOLFOX-4 (оксалиплатин 85 мг/м², в 1 день, ЛВ 200 мг/м² 2 ч, 5-ФУ 400 мг/м² струйно, 5-ФУ 600 мг/м² 22 ч, в 1-й и 2-й дни каждые 2 недели) и FOLFOX-4 + бевацизумаб для больных, ранее получавших лечение режимами, включавшими иринотекан и фторпиримидины. Успешным оказалось применение этих препаратов даже в III–IV линии химиотерапии. Добавление Авастина позволило значительно улучшить отдаленные результаты лечения больных, получавших химиотерапию, основанную на комбинации 5-фторурацил+лейковарин.

L.B. Saltz et al. [18] оценивали у больных КРР сочетание бевацизумаба и цетуксимаба с иринотеканом или без него в III–IV линии лечения (после предшествовавшей терапии оксалиплатином и иринотеканом). В группе использования иринотекана общая эффективность составила 78 %, время до прогрессирования – 5,8 мес.

В группе получавших только таргетные препараты, общая эффективность составила также 78 %, но время до прогрессирования было значительно меньше – 4 мес.

Таким образом, по предварительным результатам пока не отмечено увеличения выживаемости. В настоящее время планируются или проводятся несколько рандомизированных исследований по комбинации авастина с FOLFOX в качестве 1 или 2 линии химиотерапии.

В 2007 г. данные об эффективности и безопасности применения бевацизумаба в комбинации с химиотерапией при метастатическом колоректальном раке были получены в так называемом постмаркетинговом исследовании BEAT, показавшем, что эффективность и безопасность препарата в подобных условиях сопоставимы с результатами регистрационных исследований [13].

Были проведены и другие исследования с целью оценки эффективности и безопасности бевацизумаба при включении его в схему химиотерапии первой линии на основе оксалиплатина (либо капецитабин + оксалиплатин (XELOX) или фторурацил/лейковорин + оксалиплатин (FOLFOX-4) у больных с МКРР; [10; 15]).

Больные с МКРР были рандомизированы в соответствии с дизайном по схеме 2 × 2 на группы XELOX в сравнении FOLFOX-4, и затем на группы бевацизумаба в сравнении с плацебо. Первичной целью была оценка времени до прогрессирования заболевания (табл. 2.)

Таблица 1

Общая эффективность и выживаемость больных KPP при химиотерапии 5-фторурацил/лейковорин + бевацизумаб

Показатель	1 группа n=36	2 группа n=35	3 группа n=33
Общая эффективность, %	17	40	24
Время до прогрессирования, мес.	5,2	9,0	7,2
Общая выживаемость, мес.	13,8	21,5	16,1

Таблица 2

Влияние бевацизумаба на время до прогрессирования заболевания

Схема химиотерапии	Дизайн исследования	Медиана времени до прогрессирования заболевания, мес.
XELOX	плацебо	8,0
	бевацизумаб	9,4
FOLFOX-4	плацебо	8,0
	бевацизумаб	9,2

Всего в группы такого анализа по схеме 2 × 2 рандомизирован 1401 больной. Медиана времени до прогрессирования заболевания составила 9,4 мес. в группе с бевацизумабом и 8,0 мес. в группе плацебо. Медиана общей выживаемости – 21,3 мес. в группе с бевацизумабом и 19,9 мес. в группе плацебо. Как следует из табл. 2, уровень ответа был одинаков в обеих группах.

Анализ исключения из исследования показал, что, несмотря на возможность продолжения лечения по протоколу до начала прогрессирования заболевания, только 29 и 47% получавших бевацизумаб и плацебо соответственно, продолжали лечение до начала прогрессирования заболевания. Профиль токсичности бевацизумаба соответствовал тому, который был указан по документации предыдущих исследований.

Добавление бевацизумаба к химиотерапии, основанной на оксалиплатине, значительно улучшило время до прогрессирования заболевания в этом исследовании первой линии у пациентов с метастатическим KPP [15].

Выводы

Противоопухолевый препарат Авастин (бевацизумаб) представляет собой рекомбинантные, гуманизированные моноклональные антитела, которые избирательно связываются с биологически активным фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и нейтрализуют его. По результатам многих исследований было показано, что у больных колоректальным раком экспрессия VEGF возрастает. Авастин ингибирует связывание VEGF с рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, что приводит к снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли.

Добавление Авастина к химиотерапии (Оксалиплатин, Иринотекан, др.) позволяет значительно увеличить продолжительность жизни (общую и до начала прогрессирования процесса) у пациентов, получающих первую или вторую линию химиотерапии, что подтверждается результатами большинства рандомизированных контролируемых исследований. Также было показано увеличение общей выживаемости, в среднем на 4,7 мес. при проведении первой линии и в среднем на 2,1 месяца – второй линии химиотерапии.

В рандомизированных клинических исследованиях Авастин дополнял различные схемы химиотерапии – LF, IFL, FOLFIRI, FOLFOX, XELOX и др. В этих исследованиях получены результаты,

подтверждающие увеличение эффективности первой линии метастатического колоректального рака.

В пилотном исследовании III фазы Авастин дополнял схему IFL [11], что достоверно увеличило общую выживаемость, среднее время до прогрессирования, частоту объективных эффектов и 1-летнюю выживаемость.

В другом исследовании III фазы [15], где оценивалось дополнение Авастина к схемам FOLFOX и XELOX, показано увеличение продолжительности временного интервала до начала прогрессирования (без увеличения частоты объективных эффектов).

Большинство других исследований также подтвердило улучшение основных показателей эффективности лечения.

Во второй линии терапии, в исследовании III фазы, добавление Авастина к режиму FOLFOX4, при метастатическом колоректальном раке достоверно улучшило общую выживаемость, среднее время до начала прогрессирования и частоту объективных эффектов [18].

Контролируемые исследования, в которых оценивалось сочетание Авастина с Цетуксимабом и Иринотеканом, показали эффективность данной терапии, ее допустимую токсичность (комбинации Авастина с препаратами Панитумумаб и Тарцева не улучшили общих результатов, определены как достаточно токсичные; [15; 18; 19]).

По результатам, полученным в этих исследованиях, переносимость Авастина у больных метастатическим колоректальным раком оказалась приемлемой; регистрировались частые осложнения, в основном легкой и умеренной степени.

Добавление Авастина к химиотерапии практически не утяжеляло общей токсичности; отмечались легкий геморрагический синдром, проявлявшийся носовыми кровотечениями, гипертония и протеинурия. Осложнения III–IV степени тяжести наблюдались редко. Специфические осложнения Авастина, такие как артериальные тромбозы, желудочно-кишечные перфорации, кровотечения из полых органов могут представлять угрозу для жизни.

Таким образом, дополнение Авастина к лекарственным схемам FOLFIRI, FOLFOX, XELOX является наиболее эффективным вариантом первой и второй линии терапии метастатического колоректального рака. Данные схемы позволяют добиться максимального терапевтического эффекта и увеличить продолжительность жизни: средняя выживаемость при химиотерапии с применением таргетных препаратов превышает 2-летний срок [1; 14; 16; 19; 21].

Литература

1. Гарин А.М., Базин И.С. Справочное руководство по лекарственной терапии солидных опухолей. – М.: Издательство «ЧеРо», 2007. – 300 с.
2. Гарин А.М., Базин И.С., Канагавел Д. Таргетные препараты в терапии больных диссеминированным раком толстой кишки // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2009. – № 8. – С. 17–20.
3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2009. – Т. 20, №3(77), прил. 1.
4. Жукова Л.Г. Длительное и безопасное применение Авастина при метастатическом колоректальном раке: клинический опыт применения // Современная онкология – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 33–7.
5. Носов Д.А. Таргетная терапия злокачественных новообразований // Вместе против рака. – 2004. – С. 17–24.
6. Arnold D. Bevacizumab plus chemotherapy as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer. First results from a large community-based observational cohort study in Germany. Poster number 439 at ASCO GI 2010. Abstract.
7. Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy // J. Clin. Oncol. – 2002. – 20. – P. 4368–80.
8. Ferrara N., Hillan K.J., Gerber H.P. et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer // Nat. Rev. Drug Discovery. – 2004. – 3. – P. 391–400.
9. Giantonio B., Catalano P. High-dose bevacizumab improves survival when combined with FOLFOX in previously treated advanced colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study E3200 // J Clin Oncol. – 2005. – 23. – 16S.
10. Hecht J. Randolph, Mitchell Edith, Chidiac Tarek et al. A Randomized Phase IIIB Trial of Chemotherapy, Bevacizumab, and Panitumumab Compared With Chemotherapy and Bevacizumab Alone for Metastatic Colorectal Cancer // JCO. – 2009. – Feb 10. – P. 672–80.
11. Hurwitz H. Bevacizumab plus irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin for the treatment of metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III trial // N Engl J Med. – 2004. – 350. – P. 2335–42.
12. Kabbinnar F.F., Schulz J., McCleod M. et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: Results of a randomized phase II trial // Am. J. Health-Syst. Pharm. – 2005. – 62. – P. 1021–32.
13. Kretschmar A., Cutsem E.V., Michael M. et al. Preliminary efficacy of bevacizumab with first-line FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and monotherapy for mCRC: First BEATrial // J Clin Oncol. – 2007. – 25. – P. 4072.
14. Kubala E. Safety and effectiveness of bevacizumab in combination with chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer in elderly population: updated results from a large Czech observational registry. Poster at ASCO GI 2010. Abstract.
15. Leonard B. Saltz, Stephen Clarke, Eduardo Diaz-Rubio et al. Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin-Based Chemotherapy As First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase III Study // JCO. – 2008. – Apr 20. – P. 2013–9.
16. Liuvre A., Samalin E. Bevacizumab plus FOLFIRI or FOLFOX in chemotherapy-refractory patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective study // BMC Cancer. – 2009. – Sep 28. – 9. – P. 347.
17. Malik A.K., Gerber H.P. Targeting VEGF ligands and receptor in Cancer // Targets. – 2004. – 2. – P. 48–57.
18. Saltz L.B. Randomized Phase II Trial of Cetuximab/Bevacizumab/Irinotecan (CBI) versus Cetuximab/Bevacizumab (CB) in Irinotecan-Refractory Colorectal Cancer. // Proceedings ASCO. – 2005. – Abstract 3508.
19. Sharma S., Abhyankar V., Burgess R.E. et al. A phase I study of axitinib (AG-013736) in combination with bevacizumab plus chemotherapy or chemotherapy alone in patients with metastatic colorectal cancer and other solid tumors // Ann Oncol. – 2010. – 21(2). – P. 297–304.
20. Willett C.G., Boucher Y., di Tomaso E. et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer // Nat. Med. – 2004. – 10. – P. 145–7.
21. Yildiz R., Buyukberber S., Uner A. et al. Bevacizumab plus irinotecan-based therapy in metastatic colorectal cancer patients previously treated with oxaliplatin-based regimens // Cancer Invest. – 2010. – 28(1). – P. 33–7.

УДК 616-006-091.8

*В.И. Масычева, А.О. Белкина, Е.Д. Даниленко, Г.М. Сысоева***НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ
ПРЕПАРАТОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ***Институт медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск Новосибирской обл.***Контактная информация:***Масычева Валентина Ивановна, д-р биол. наук, профессор, директор института медицинской биотехнологии***адрес:** 633010, г. Бердск-10 Новосибирской обл., а/я 112; **тел.** +7(383)415-80-91;**e-mail:** irinashubina@mail.ru

Статья поступила: 29.07.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Фактор некроза опухоли человека имеет высокий противоопухолевый потенциал. В обзоре представлены сведения о клинических испытаниях препаратов на основе фактора некроза опухоли человека, которые проводятся в разных странах.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли, онкология, клинические испытания.*V.I. Masysheva, A.O. Belkina, E.D. Danilenko, G.M. Sysoeva***SOME ASPECTS OF CLINICAL TRIALS OF THE TNF- α BASED PREPARATIONS***IMBT FSRI SRC VB "Vector", Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region***Abstract**

Human tumor necrosis factor has a high antitumor activity. In this review we discuss the recent data presented by various countries on clinical trials of human tumor necrosis factor' preparations.

Key words: tumor necrosis factor, oncology, clinical trials.**Введение**

Поиск средств и способов лечения злокачественных новообразований продолжает оставаться актуальным направлением онкологии. Особое положение занимают исследования, направленные на применение и совершенствование цитокинотерапии онкологических заболеваний. Фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α , ФНО, TNF) в течение многих лет привлекает внимание исследователей, фармакологов, клиницистов, что связано с его избирательной способностью тормозить рост и вызывать лизис злокачественных клеток, геморрагический некроз опухолей, активировать иммунный противоопухолевый ответ, оказывать повреждающее действие на сосуды.

Вместе с тем, результаты доклинических исследований и I–II фаз клинических испытаний ФНО- α при системном введении показали наличие побочных эффектов, которые служат серьезным препятствием для широкого применения препаратов ФНО в онкологии (гипотензия, почечная недостаточность, резкое повышение свертываемости крови, нарушения сосудистой системы внутренних органов, индукция коллапса сосудов, лихорадка, озноб, тахикардия, головная боль и т.д.).

Поэтому в настоящее время ученые всего мира работают над созданием новых форм и способов применения препаратов рекомбинантного ФНО- α с целью увеличения терапевтического индекса, снижения выраженности побочных эффектов [17; 18; 19; 28; 44].

На ранних этапах проведения биомедицинских исследований специалисты предполагали, что положительных эффектов в терапии онкологических заболеваний можно достичь при системном применении препарата рекомбинантного ФНО. Однако эти предположения не подтвердились. В настоящее время существуют различные подходы к

использованию ФНО в лечении, описанные в научной литературе. Это совместное использование ФНО- α с другими противоопухолевыми препаратами и с цитокинами, а также локальное и внутриопухолевое введение препарата [18]. Однако более перспективными в настоящее время представляются подходы по созданию новых форм препаратов ФНО- α : мутантных форм ФНО со сниженной токсичностью; ФНО, слитого с другими белками и пептидами; молекул ФНО, модифицированных полимерами; препаратов ФНО в средствах доставки [10]. Не менее перспективны и подходы, объединяющие разные методы.

В данном обзоре представлена информация о выполнении клинических испытаний препаратов на основе ФНО- α и о новых разработанных подходах к лечению онкологических заболеваний.

**Созданные и разрешенные
к применению препараты на основе ФНО- α**

В настоящее время в доступной литературе описано два зарегистрированных и разрешенных к применению препарата на основе рекомбинантного фактора некроза опухоли альфа человека. Первый препарат был разработан в Европе фирмами Boehringer Ingelheim Austria GmbH – Manuf.; R&D; Tech., Boehringer Ingelheim Pharma KG – Europe mark.; Parent, Nycomed Austria GmbH – Manuf. Other, Nycomed Group A/S – Parent, Bender & Co. GmbH (коммерческое название Беромун (Beromun), международное непатентованное название (МНН) – tasonermine). Он является рекомбинантным негликозилированным фактором некроза опухоли α -1a, представляет тример белка, экспрессированного в трансформированных *E. coli*. Этот гомотример состоит из трех идентичных цепей, (мономеры состоят из 157 аминокислот и имеют мол. массу 17.35 kDa), связанных через дисульфидные мостики в позициях 69 и 101 каждой белковой цепи.

Более 10 лет тому назад был получен положительный опыт внутриартериального использования этого препарата ФНО- α в клиниках многих европейских стран перед оперативным лечением саркомы мягких тканей конечностей и при лечении неоперабельных больных [35]. Эффект Беромуна связывают с повреждением сосудов злокачественной опухоли. [35]. Беромун рекомендован для изолированной лимб-перфузии саркомы мягких тканей [33]. В США Беромун в комплексе с мелфаланом проходит стадию клинических испытаний для лечения саркомы почечных лоханок методом изолированной лимб-перфузии [32]. Это свидетельствует как о расширении сферы применения препарата Беромун, так и об эффективности метода изолированной лимб-перфузии. В Российской Федерации в Государственном реестре лекарственных средств Беромун не зарегистрирован [37; 38].

Второй медицинский препарат, включающий ФНО- α , зарегистрирован в РФ (Электронная база «Сведения о зарегистрированных лекарственных средствах») [38] и представляет собой препарат генно-инженерного слитого белка фактора некроза опухоли альфа человека и тимозина-альфа1, расположенного на С-конце молекулы (коммерческое название Рефнот, производитель ООО «Рефнот-Фарм»). Препарат обладает прямым противоопухолевым действием *in vitro* и *in vivo* на различных линиях опухолевых клеток [6; 7]. По спектру цитотоксического и цитостатического действия на опухолевые клетки препарат соответствует фактору некроза опухоли альфа человека, но имеет меньшую общую токсичность, чем ФНО. Рекомендовано применение препарата при раке молочной железы в комплексной терапии с химиопрепаратами. Возможно применение при онкологических заболеваниях до и после хирургического удаления опухоли совместно с радиотерапией, химиопрепаратами или в комбинации с интерлейкинами-2, -12 и α -2- или γ -интерферонами. В случаях запущенных неоперабельных опухолей обкалывание опухоли Рефнотом позволяет существенно уменьшить ее размер, после чего провести ее хирургическое удаление [34]. Следует обратить внимание, что Рефнот с точки зрения современной фармацевтики представляет собой препарат нового поколения, в котором сочетаются свойства двух связанных между собой белков, аналогичных белкам человека. Авторы не исключают возможности применения препарата при заболеваниях, вызываемых вирусами герпеса, цитомегаловирусом и др. (кроме СПИДа) и при заболеваниях, передающихся половым путем: хламидиоз, уреаплазмоз (в сочетании с антибиотиками и α -2- или γ -интерферонами).

Клинические испытания препаратов ФНО- α

В настоящее время продолжаются клинические испытания ряда препаратов ФНО при различных способах введения для лечения онкологических заболеваний разной локализации [22; 23; 30]. В США клинические испытания ФНО- α описаны в базе данных по клиническим испытаниям США (ClinicalTrials.gov.), которая содержит около 90 000 описаний испытаний, поддерживаемых National Institutes of Health, другими федеральными агентствами и частными фирмами США и проводимых более чем в 170 странах (табл. 1) [32].

Анализ приведенной в таблице информации показывает, что значительная часть клинических испытаний ФНО в США посвящена лечению с помощью метода изолированной перфузии в сочета-

нии с химиопрепаратом мелфаланом, интерфероном-гамма, в том числе в условиях гипертермии.

Применение ФНО с другими цитокинами и противоопухолевыми антибиотиками – широко используемый подход для увеличения эффективности лечения, позволяющий снизить системную токсичность. Так, результаты проведения II фазы клинических испытаний ФНО с дактиномицином при опухоли Вильмса (злокачественная опухоль паренхимы почки) у детей, опубликованные в 2008 г., показали, что такая комбинация не слишком токсична и удовлетворительно переносилась пациентами. Болезнь стабилизируется, что предполагает противоопухолевый эффект [22].

Локальное и региональное введение препарата перспективно с точки зрения максимальной доставки лекарства и минимизации системной токсичности [12; 16]. Применение гипертермии при изолированной региональной перфузии позволяет снизить применяемые дозы ФНО-альфа. Добавление к такой терапии интерферона- γ дает хороший эффект при лечении немеланомного рака кожи у пациентов, которые до такого лечения были кандидатами на ампутацию конечности [29]. Метод региональной перфузии применим не только для введения препарата в конечности, но и для полной сосудистой изоляции печени. Локорегиональное и внутриопухолевое введение ФНО- α было успешным для достижения ингибирования роста и регрессии опухоли печени в клинике [9; 18; 20]. Метод изолированной перфузии таза препаратами ФНО- α совместно с мелфаланом планируется использовать для лечения саркомы почечной лоханки. В настоящее время, как указывалось выше, в США рекрутируются больные для такого клинического испытания [32].

В других испытаниях показана эффективность и сниженная токсичность при локальном внутриопухолевом введении препаратов ФНО. Так, при введении внутрь простаты ФНО и системном введении ИФН- α обнаружен более низкий уровень токсичности, чем при системном введении одного ФНО- α [11; 17]. Chcialowski A. et al. в 1997 г. показали, что введение ФНО в опухолевые массы в бронхи снижает побочные эффекты, а при совместном использовании с такими цитокинами, как интерферон- γ , интерлейкин-2 и цитостатическими препаратами этопозид и циклофосфамид установлен синергидный противоопухолевый эффект. Показано, что при внутриопухолевом введении препарата ФНО в глиому и астроцитому не наблюдается системной токсичности и обнаружен хороший противоопухолевый эффект [15; 24; 43].

Вместе с тем, развиваются новые направления по созданию высокоэффективных и безопасных противоопухолевых средств на основе ФНО- α , связанные с созданием мутантных вариантов молекулы ФНО; конъюгатов ФНО с другими белками и пептидами; молекул ФНО, модифицированных полимерами; а также препаратов ФНО в средствах доставки [10]. В биологических экспериментах показано, что такие формы препаратов ФНО проявляют сниженную системную токсичность, увеличенные противоопухолевый эффект, период полужизни ФНО- α в плазме крови и накопление в опухоли, по сравнению с немодифицированным ФНО. Некоторые из таких препаратов вышли также на стадию клинических испытаний.

Особо следует отметить, что в США проводятся испытания препарата ФНО, связанного с коллоидальным золотом, для лечения метастазированных и запущенных твердых опухолей (табл. 1) [32].

Таблица 1

Перечень клинических испытаний препаратов ФНО-α в США

Название испытания	Лекарство
<i>Статус: выполнены</i>	
I/II фаза изучения внутриопухолевого рекомбинантного фактора некроза опухоли у пациентов с кожной саркомой Капоши, связанной с ВИЧ-инфекцией	ФНО
Изучение фактора некроза опухоли и интерферона гамма человека у пациентов с ВИЧ-ассоциированным комплексом	ФНО+ ИФН-γ-1b
Фактор некроза опухоли у пациентов, подвергшихся хирургии первичной опухоли и метастатического рака (аденокарцинома; рак молочной железы; колоректальный рак; желудочно-кишечный рак; рак почки; рак печени; меланома кожи; рак яичника; рак поджелудочной железы; саркома)	Коллоидальное золото, связанное с ФНО
Коллоидальное золото, связанное с фактором некроза опухоли в лечении пациентов с запущенными твердыми опухолями (твердые опухоли взрослых неизвестного происхождения)	Коллоидальное золото, связанное с ФНО
Изолированная перфузия конечностей мелфаланом с фактором некроза опухоли и без него в лечении пациентов с саркомой мягких тканей руки или ноги (стадии IVB, IVA, III, IIB, IIC и рецидивы саркомы мягких тканей взрослых)	Мелфалан+ ФНО
Мелфалан с фактором некроза опухоли и без него в лечении пациентов с локальной запущенной меланомой руки или ноги	ФНО+мелфалан, (изолированная перфузия конечностей)
Рандомизированная III фаза гипертермической изолированной перфузии конечностей с мелфаланом, фактором некроза опухоли и интерфероном-γ у пациентов локальной запущенной агрессивной меланомой	Мелфалан+ФНО+ИФН-γ; (изолированная перфузия конечностей с гипертермией)
Вторая фаза клинических испытаний рекомбинантного фактора некроза опухоли α в комбинации с дактиномицином у детей с рецидивами опухоли Вильмса	ФНО+дактиномицин
<i>Статус: набор добровольцев</i>	
Изолированная перфузия таза и конечностей в лечении локальной запущенной саркомы таза и конечностей (саркома почечной лоханки)	Tasonermine+мелфалан

Таблица 2

Перечень клинических испытаний NGR-hTNF, проводимых в США (по Clinical trials gov)

Название испытаний	Лекарство
<i>Статус: выполнены</i>	
Изучение NGR-hTNF в комбинации с Doxorubicin на твердых опухолях	NGR-hTNF Доксорубицин
Модифицированная I фаза изучения NGR-hTNF на запущенных твердых опухолях	NGR-hTNF
<i>Статус: активные, нет набора добровольцев</i>	
NGR-TNF в лечении пациентов с запущенными твердыми опухолями (колоректальный рак; рак головы и шеи; рак почек; неспецифичные твердые опухоли взрослых)	CNGRC-hTNF
Изучение NGR-hTNF в комбинации с цисплатином на твердых опухолях	NGR-hTNF; Цисплатин
Применения NGR-hTNF в комбинации со стандартным базовым протоколом Oxaliplatin у пациентов метастатическим колоректальным раком	NGR-hTNF; Оксалиплатин, Капецитабин
Изучение NGR-hTNF как единственного агента у пациентов, пораженных запущенной или метастатической опухолью плевральной мезотелиомы	NGR-hTNF
Изучение NGR-hTNF как единственного агента у пациентов, пораженных колоректальным раком (CRC)	NGR-hTNF
<i>Статус: набор добровольцев</i>	
Изучение применения NGR-hTNF в высоких дозах для лечения твердых опухолей	NGR-hTNF
Применения NGR-hTNF в комбинации со стандартной химиотерапией для лечения пациентов с запущенным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC)	NGR-hTNF; Цисплатин, Гемцитабин, Пеметрексед
Изучение NGR-hTNF как единственного агента у пациентов, пораженных запущенной или метастатической гепатоцеллюлярной саркомой (HCC)	NGR-hTNF
Изучение NGR-hTNF в комбинации с Доксорубицином у пациенток, пораженных запущенным или метастатическим раком яичников	NGR-hTNF; Доксорубицин
Изучение NGR-hTNF в комбинации с Доксорубицином у пациентов, пораженных запущенной или метастатической мелкоклеточной карциномой легких	NGR-hTNF; Доксорубицин
<i>Статус: пока нет набора добровольцев</i>	
Изучение NGR-hTNF в комбинации с Доксорубицином у пациентов, пораженных саркомой мягких тканей	NGR-hTNF; Доксорубицин

Препарат представляет собой наночастицы размером 33 нм, покрытые полиэтиленгликолем и содержащие коллоидальное золото с ФНО (несколько сотен молекул ФНО на одну наночастицу). В проведенных на животных экспериментах было установлено, что нанопрепарат накапливается в основном в опухоли MC-38 карциномы толстой кишки. Противоопухолевый эффект ФНО, связанного с коллоидальным золотом, был выше, а токсические свойства снижены по сравнению с ФНО. При этом применение метода гипертермии (до температуры +42,5 °C) значительно нарушало кровоснабжение опухоли [14; 41]. Результаты клинических испытаний пока не опубликованы. Представленные данные отражают также тот факт, что арсенал средств для онкотерапии, содержащих ФНО, пополняется нанопрепаратами.

Помимо разрешенного к применению препарата слитого белка ФНО-тимозин-α (Рефнол), пример продвинутых исследований препаратов ФНО на основе слитого белка являются клинические исследования в США слитого белка NGR-TNF (NGR-ФНО) для лечения онкологических заболеваний. Трипептидная последовательность NGR (Asn-Gly-Arg) также имеет средство к сосудам опухоли и активно изучается из-за способности доставки цитокинов, химиотерапевтических препаратов, пептидов апоптоза и липосом к CD13, экспрессируемым в опухолевых кровеносных сосудах. Рецептором для NRG на опухолевых сосудах является аминокептидаза N (ее также называют CD13), которая присутствует на эндотелиальных клетках опухолей мышей и человека [30]. Показано, что связывание NRG с противоопухолевыми препаратами (доксорубицином и мелфаланом) приводит к увеличению накопления лекарств в опухолевых тканях и увеличению, тем самым, терапевтической эффективности. Применение NGR-TNF приводит к эффективному переносу ФНО к сосудам опухоли и увеличивает проницаемость для ФНО. При этом ФНО в составе слитого пептида в дозах, в 105 раз меньших, имеет тот же эффект, что не сшитый ФНО [31]. Перспективно создание липосомальных форм NGR-TNF. Созданы липосомы, содержащие противоопухолевые средства и связанные с NGR-TNF, которые также могут стать новой стратегией в повышении химиотерапевтического индекса препаратов [40].

Клинические испытания NGR-TNF для лечения метастазированных и запущенных солидных опухолей проводятся с 2004 г., в том числе в комбинации с другими противоопухолевыми средствами: цисплатином, доксорубицином, оксалиплатином, капецитабином, гемцитабином и пеметрекседом (табл. 2).

Из представленных в таблице данных следует, что препарат NGR-hTNF испытывается как в качестве средства для монотерапии, так и в сочетании с другими противоопухолевыми средствами для лечения метастазированных и запущенных опухолей разной локализации, так как обладает большим противоопухолевым эффектом.

Перспективным подходом к созданию эффективных и безопасных противоопухолевых препаратов является конструирование мутантных вариантов природного фактора некроза опухолей. Генно-инженерные варианты ФНО-α (мутеины) начали создавать с конца 1980-х гг. Miyata et al. в 1992 г. описали мутеин F4236. Этот белок имеет клеточно-адгезивную последовательность (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) на N-конце. В отличие от дикого типа, мутеин F4236 проявляет противоопухолевую ак-

тивность на мышцах с фибросаркомой и меланомой. Shikama et al. в 1995 г. описали другое производное, мутеин F4614, также несущий клеточно-адгезивную последовательность, но другую точку мутации. Белок проявляет значительно уменьшенный гипотензивный эффект и высокую эффективность на мышцах с трансплантированной фибросаркомой. Kuroda et al. в 1995 г. описали 8 мутеинов, в которых остаток 29Arg был замещен на другие аминокислоты. Некоторые из них имели более низкую токсичность и более высокий противоопухолевый потенциал [36].

В целом, эти направления исследований привели к получению ряда мутантных ФНО со свойствами, отличными от свойств их природного ФНО, и выведению новых препаратов на клинические испытания.

В ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» был разработан ряд мутантных ФНО-α. Были получены два мутантных ФНО с заменами аминокислот в 31 и 32 положении. Биологические исследования показали, что мутантные рекомбинантные белки сохраняют присущую исходному белку противоопухолевую активность, но отличаются менее выраженными токсическими свойствами, а также повышенной устойчивостью к протеолизу и дольше циркулируют в кровеносном русле лабораторных животных [2; 4]. Наиболее удачным вариантом мутантного аналога оказался рекомбинантный ФНО-альфа человека с делецией 4 аминокислот с N-конца. На его основе был создан препарат Альнорин. В ходе клинических исследований, выполненных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва), были всесторонне изучены эффекты Альнорина на диссеминированную меланому кожи и его безвредность [3]. В отличие от зарубежных аналогов Альнорин не оказывал гипотонического действия, его побочные эффекты носили транзиторный характер и снимались симптоматической терапией [5]. Включение в режимы лечения Альнорина приводило к значимому снижению частоты развития гематологической токсичности химиотерапии. Внутритропухолевое введение Альнорина сопровождалось умеренным и выраженным болевым синдромом, гиперемией и отеком кожи, асептическим воспалением. Анализ результатов показал, что введение Альнорина с последующей химиотерапией улучшает лечебный результат, общий ответ составил 53 %. [3]. Было установлено, что снижение частоты побочных эффектов, достоверное увеличение числа выживших больных наблюдалось в случаях, когда Альнорин применяли перед курсами ХТ. Этот факт, видимо, связан с тем, что, как показано авторами, Альнорин в концентрациях 100 и 1000 МЕ/мл, не токсичных для клеток, повышал цитотоксический эффект Доксорубина на клетках HeLa-bcl2 и клетках «дикого» типа (в 12,3 и 7,9 раза соответственно). При меланоме Альнорин снижал резистентность к ACNU и Дакарбазину, в максимальной степени в отношении опухолевых клеток с гиперэкспрессией Bcl-2 [3].

На стадии клинических испытаний находится растворимый 17 kDa рекомбинантный мутеин ФНО – TNF-SAM2, созданный японскими учеными [13; 39; 45]. TNF-SAM2 – производное ФНО-альфа с увеличенной основностью N-концевой области. Данный мутеин имеет более широкий спектр противоопухолевой активности, чем природный ФНО, меньшие токсичность и побочные эффекты. Он может быть использован в больших дозах для перфузии неоперабельных опухолей [26; 27], в том числе неоперабельных опухолей печени совместно с другими химиотерапевтическими средствами [25; 26].

Показано, что при внутриопухолевом введении мутантного белка в глиому не наблюдалось системной токсичности и был отмечен терапевтический эффект [24; 43].

Выраженный противоопухолевый эффект был обнаружен при лечении астроцитомы с помощью TNF-SAM2 совместно с ранимустином [15]. При этом не наблюдалось серьезной гематологической и общей токсичности.

Применение совместно с этопозидом и карбоплатином также дало обнадеживающие результаты [43]. Было предложено использовать TNF-SAM2 для изолированной перфузии неоперабельных опухолей печени совместно с другими химиотерапевтическими средствами [26].

Кроме того, создан и исследуется липосомальный вариант мутеина TNF-SAM2. Каприлированный TNF-SAM2 связывался в малые униламеллярные везикулы (SUVs) или инкапсулировался в мультиламеллярные везикулы (MLVs).

Свободный и каприлированный TNF-SAM2 в липосомах исследовали на собаках для оценки индукции гипотензии и на модели мышинной Meth A саркомы для оценки эффективности. В то время как системное введение ФНО анестезированным непородистым собакам приводило к острому шоку, системное введение SUV-TNF-SAM2 не приводило к гипотензии. Липосомальный каприлированный TNF-SAM2 имел более высокий терапевтический индекс, чем свободный ФНО или свободный TNF-SAM2 [8].

II–III фазу клинических исследований в течение 2000–2002 гг. в Китае проходил мутантный аналог ФНО-альфа (rmhTNF) [21]. Совместное использование mhTNF с химиотерапией дало хорошие результаты при лечении опухолей разной локализации: рака желудка и колоректального рака.

Таким образом, из представленных данных очевидно, что использование мутантных вариантов ФНО-α в сочетании с противоопухолевыми препаратами позволяет достичь положительных клинических эффектов.

Выводы

Приведенные примеры свидетельствуют о том, что в настоящее время во многих странах мира ведутся разработки и широкие исследования новых форм ФНО-α с целью создания на их основе эффективных противоопухолевых средств, многие из них уже проходят стадии клинических испытаний.

Дальнейшая деятельность по разработке высокоэффективных и безопасных противоопухолевых средств на основе ФНО-α связана с созданием мутантных вариантов молекулы ФНО, модификацией молекул ФНО-альфа полимерами; молекул ФНО в составе слитых белков и в средствах доставки, а также с разработкой подходов, объединяющих разные методы.

Появляются новые сведения о нанопрепаратах ФНО для онкологии, их первичных испытаниях на людях.

Учитывая особенности физико-химических, фармакологических свойств, повышение тропности к опухолевым тканям препаратов в виде наноконструкций, включающих ФНО, можно ожидать в ближайшее время появления новых эффективных способов борьбы с онкологическими заболеваниями.

Все это свидетельствует о необходимости и перспективности дальнейших исследований по созданию новых отечественных противоопухолевых препаратов ФНО-α с улучшенными терапевтическими свойствами.

Литература

1. *Абрамов М.Е., Гуторов С.Л., Масычева В.И. и др.* Клиническое применение альнорина при диссеминированной меланоме кожи // Биотехнология и онкология: 1-я Рос.-Амер. конф., СПб., 29–31 мая 2005 г: Тез.докл. – СПб., 2005. – С.40–1.
2. *Гамалей С.Г., Сысоева Г.М., Фадина В.А. и др.* Сравнительное изучение провоспалительных свойств мутантных аналогов ФНО-альфа. // Вест. Урал. мед. академ. науки. – 2009. – №2/1(24). – С. 24–5.
3. *Гуторов С.Л.* Цитокины в современном комбинированном лечении некоторых злокачественных опухолей. Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2009, 40 с.
4. *Даниленко Е.Д., Лебедев Л.Р., Сысоева Г.М. и др.* Поиск способов улучшения терапевтических свойств фактора некроза опухоли альфа как средства лечения онкопатологии // Рос. иммунол. ж. – 2008. – Т.2 (II), № 2/3. – С. 306.
5. *Даниленко Е.Д., Масычева В.И., Пустошилова Н.М.* Новый противоопухолевый препарат на основе рекомбинантного фактора некроза опухоли альфа – альнорин. Результаты изучения и проблемы внедрения в клиническую практику // Биотехнология и онкология: 1-я Рос.-Амер.конф., СПб., 29–31 мая 2005 г: Тез. докл. – СПб., 2005. – С. 23.
6. *Шмелев В.А.* Фактор некроза опухолей, тимозин альфа1 и интерферон-гамма – иммуномодулирующие, противоопухолевые и противои инфекционные цитокины. – М.: Фармаклон, 2006. – 101 с.
7. *Шмелев В.А.* Интерферон-гамма, фактор некроза опухолей, тимозин-альфа1 – противои инфекционные и противоопухолевые цитокины и препараты. – М.: «МедПрактика-М», 2008. – 536 с.
8. *Akimaru K., Auzenne E., Akimaru Y. et al.* Formulation and antitumor efficacy of liposomal-caprylated-TNF-SAM2 // Cytokines Mol. Ther. – 1995. – 1(3). – P. – 197–210.
9. *Alexander H.R., Libutti S.K., Bartlett D.L. et al.* A phase I-II study of isolated hepatic perfusion using melphalan with or without tumor necrosis factor for patients with ocular melanoma metastatic to liver // Clin. Cancer Res. – 2000. – 6(8). – P. 3062–70.
10. *Almeida A.J. and Souto E.* Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – 59(6). – P. 478–90.
11. *Bertilaccio M.T., Grioni M., Sutherland B.W. et al.* Vasculature-targeted tumor necrosis factor-alpha increases the therapeutic index of doxorubicin against prostate cancer//Prostate. – 2008. – 68(10). – P. 1105–15.
12. *Bonvalot S., Laplanche A., Lejeune F. et al.* Limb salvage with isolated perfusion for soft tissue sarcoma: could less TNF-alpha be better? // Ann Oncol. – 2005. – 16(7). – P. 1061–8.
13. *De Wilt J.H., Soma G., ten Hagen T.L. et al.* Synergistic antitumor effect of TNF-SAM2 with melphalan and doxorubicin in isolated limb perfusion in rats // Anticancer Res. – 2000. – 20(5B). – P. 3491–6.

14. Farma J.M., Puhlmann M., Soriano P.A. et al. Direct evidence for rapid and selective induction of tumor neovascular permeability by tumor necrosis factor and a novel derivative, colloidal gold bound tumor necrosis factor // *Int. J. Cancer.* – 2007. – 120(11). – P. 2474–80.
15. Fukushima T., Yamamoto M., Oshiro S. et al. Recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha (TNF-SAM2) immunotherapy with ranimustine chemotherapy and concurrent radiation therapy for malignant astrocytomas // *Anticancer Res.* – 2003. – 23(6a). – P. 4473–81.
16. Hohenberger P., Latz E., Kettelhack C. et al. Pentoxifyllin attenuates the systemic inflammatory response induced during isolated limb perfusion with recombinant human tumor necrosis factor-alpha and melphalan // *Ann Surg Oncol.* – 2003. – 10(5). – P. 562–8.
17. Kramer G., Steiner G.E., Sokol P. et al. Local intratumoral tumor necrosis factor-alpha and systemic IFN-alpha 2b in patients with locally advanced prostate cancer // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2001. – 21(7). – P. 475–84.
18. Lans T.E., Bartlett D.L., Libutti S.K. et al. Role of tumor necrosis factor on toxicity and cytokine production after isolated hepatic perfusion // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – 7(4). – P. 784–90.
19. Lejeune F.J., Rüegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment // *Bull. Cancer.* – 2006. – 93(8). – P. E90–100.
20. Libutti S.K., Barlett D.L., Fraker D.L., Alexander H.R. Technique and results of hyperthermic isolated hepatic perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for the treatment of unresectable hepatic malignancies // *J. Am. Coll. Surg.* – 2000. – 191(5). – P. 519–30.
21. Liu X., Zhang X.F., Zheng Z.W. et al. The effect of chemotherapy combined with recombination mutant human tumor necrosis factor on advanced cancer // *J. Transl. Med.* – 2004. – 2(1). – P. 33.
22. Meany H.J., Seibel N.L., Sun J. et al. Phase 2 Trial of Recombinant Tumor Necrosis Factor-alpha in Combination With Dactinomycin in Children With Recurrent Wilms Tumor // *J. Immunother.* – 2008. – 31(7). – P. 679–83.
23. Mocellin S., Rossi C.R., Pilati P., Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* – 2005. – 16(1). – P. 35–53.
24. Oshiro S., Tsugu H., Komatsu F. et al. Evaluation of intratumoral administration of tumor necrosis factor-alpha in patients with malignant glioma // *Anticancer Res.* – 2006. – 26(6A). – P. 4027–32.
25. Nakamoto T., Inagawa H., Nishizawa T. et al. Antitumor effects of isolated hypoxic hepatic perfusion (IHHP) with high-dose TNF against colonic liver metastases in a rat model // *Anticancer Res.* – 2002. – 22(4). – P. 2455–9.
26. Nakamoto T., Inagawa H., Takagi K., Soma G. A new method of antitumor therapy with a high dose of TNF perfusion for unresectable liver tumors // *Anticancer Res.* – 2000. – 20(6A). – P. 4087–96.
27. NAKAMOTO. URL: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=859393> (дата обращения: 21.04.2010)
28. Rezende C.M., Goes T.S., Goes V.S et al. GM-CSF and TNF-alpha synergize to increase in vitro granuloma size of PBMC from humans induced by *Schistosoma mansoni* recombinant 28-kDa GST // *Immunol. Lett.* – 2004. – 95(2). – P. 221–8.
29. Rossi C.R., Foletto M., Mocellin S. et al. Hyperthermic isolated limb perfusion with low-dose tumor necrosis factor-alpha and melphalan for bulky in-transit melanoma metastases // *Ann. Surg. Oncol.* – 2004. – 11(2). – P. 173–7.
30. Rüegg C., Hasmin M., Lejeune F.J. and Alghisi G.C. Antiangiogenic peptides and proteins: From experimental tools to clinical drugs // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer.* – 2006. – 1765(2). – P. 155–77.
31. Sacchi A., Gasparri A., Gallo-Stampino C. et al. Synergistic antitumor activity of cisplatin, paclitaxel, and gemcitabine with tumor vasculature-targeted tumor necrosis factor-alpha // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – 12(1). – P. 175–82.
32. URL: <http://clinicaltrials.gov> (дата обращения: 15.03.2010)
33. URL: <http://emc.medicines.org.uk/medicine/2417/SPC/Beromun+1+mg/> (дата обращения: 21.06.2010)
34. URL: <http://oncology-xxi.ru/Refnot.html> (дата обращения: 02.03.2010)
35. URL: <http://www.anticancer.net/reviews/immunotherapy.php> (дата обращения: 15.03.2010)
36. URL: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=TNF-alpha%20mteins> (дата обращения: 21.06.2010)
37. URL: <http://www.drugreg.ru/Bases/WebReestrQuery.asp> (дата обращения: 10.02.2010)
38. URL: <http://www.roszdravnadzor.ru/registration/ls/spis> (дата обращения: 15.06.2010)
39. US Patent 7,485,698. Pharmaceutical composition for preventing or treating malignant glioma /Soma G.-I., Inagawa H., Kohchi C., Nishizawa T.
40. Van Laarhoven H.W., Gambarota G., Heerschap A. et al. Effects of the tumor vasculature targeting agent NGR-TNF on the tumor microenvironment in murine lymphomas // *Invest. New Drugs.* – 2006. – 24(1). – P. 27–36.
41. Visaria R.K., Griffin R.J., Williams B.W. et al. Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor-alpha delivery // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – 5(4). – P. 1014–20.
42. Yamamoto M., Fukushima T., Ueno Y. et al. Clinical significance of the expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAPII) in the treatment of glioblastoma with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha (TNF-SAM2) // *Anticancer Res.* – 2000. – 20(6A). – P. 4081–6.
43. Yamamoto M., Oshiro S., Tsugu H. et al. Treatment of recurrent malignant supratentorial astrocytomas with carboplatin and etoposide combined with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha // *Anticancer Res.* – 2002. – 22(4). – P. 2447–53.
44. Yasuoka Y., Naomoto Y., Yamatsuji T. et al. Combination of tumor necrosis factor alpha and interferon alpha induces apoptotic cell death through a c-myc-dependent pathway in p53 mutant H226br non-small-cell lung cancer cell line // *Exp. Cell. Res.* – 2001. – 271(2). – P. 214–22.
45. Yoshida A., Kohchi C., Inagawa H. et al. A soluble 17 kDa tumour necrosis factor (TNF) mutein, TNF-SAM2, with membrane-bound TNF-like biological characteristics // *Anticancer Res.* – 2006. – 26(6A). – P. 4003–7.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.714.-006.3.04-08-036

А.М. Мудунов

**ВЫБОР ТАКТИКИ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С САРКОМАМИ ОСНОВАНИЯ ЧЕРЕПА:
ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Мудунов Али Мурадович, старший научный сотрудник хирургического отделения №11, Отдел опухолей головы и шеи НИИ клинической онкологии

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(926)531-53-56; факс +7(495)324-94-90;

e-mail: ali.mudunov@inbox.ru

Статья поступила: 26.08.2010, принята к печати 22.09.2010.

Резюме

Саркомы, поражающие основание черепа, встречаются достаточно редко. Известно, что всего лишь в 15–20 % случаев они локализируются в области головы. Основной причиной неудач в лечении сарком указанной локализации в настоящее время считается частое развитие местных рецидивов после проведенного лечения. Клинический материал представлен 81 пациентом с различными саркомами основания черепа. Возрастной состав пациентов колебался от 13 до 80 лет. В группе мягкотканых сарком ($n=44$) в большинстве случаев опухоли первично локализовались в области подвисочной ямки – 50 % ($n=22$) и придаточных пазух полости носа – 34,1 % ($n=15$) случаев; в группе костных сарком ($n=37$) в области верхней челюсти – 38,5 % ($n=15$), решетчатой кости – 20,5 % ($n=8$) и нижней челюсти с вторичным поражением подвисочной ямки – 12,8 % ($n=5$) случаев. Первичные саркомы имелись у 68 пациентов, рецидивные у 13. Большинство пациентов подверглись хирургическим вмешательствам (70 %, $n=56$), при этом в 32,1 % случаев операции комбинировались с лучевой и химиотерапией. Консервативное лечение получили 22 (27,5 %) пациента. Удаление опухолей достигалось использованием различных вариантов доступов к основанию черепа с выполнением комбинированных хирургических вмешательств. Самые высокие показатели общей 5-летней выживаемости были зарегистрированы в группе мягкотканых сарком – 33,2 % (медиана 13,1 мес.), против 16,5 % (медиана 14 мес.) в группе костных сарком ($p>0,05$). Проведение химиолучевой терапии приводило к незначительному улучшению отдаленных результатов в группе мягкотканых сарком. В группе костных сарком наблюдалось значительное снижение частоты местного рецидивирования у оперированных пациентов – 67,9 % в сравнении с не оперированными – 87,5 % ($p=0,1$). Основным фактором значительного улучшения отдаленных результатов лечения в исследуемой группе являлась радикальность хирургического вмешательства. Факторами, достоверно ухудшающими отдаленные результаты лечения, оказались следующие: наличие рецидивной опухоли, первичное поражение регионарных лимфоколлекторов, поражение кавернозного синуса, первичное поражение заднего отдела и комбинированное поражение переднего и среднего отделов основания черепа. Наиболее благоприятным течением среди сарком, поражающих основание черепа обладают эмбриональная рабдомиосаркома и хондросаркома. Лучевая/химиолучевая терапия не оказывает влияние на отдаленные результаты лечения большинства костных сарком и злокачественной шванномы. В то же время она несет потенциальную возможность снижения частоты местного рецидивирования в группе мягкотканых сарком. Хирургическое вмешательство является основным компонентом в лечении сарком, поражающих основание черепа. Включение операции в лечебный план значительно улучшает отдаленные результаты лечения в группе костных сарком. Влияние указанного фактора неоднозначно в группе мягкотканых сарком, в связи с чем, операция является методом выбора в лечении остаточных и резистентных опухолей указанного морфологического ряда.

Ключевые слова: саркомы, основание черепа, хирургические вмешательства, химиотерапия, лучевая терапия.

А.М. Mudunov

**CHOICE TACTICS OF TREATMENT OF PATIENTS WITH SARCOMA BASE OF THE SKULL:
PROGNOSTIC FACTORS AND LONG-TERM RESULTS**

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

Abstract

Sarcomas of the skull base is a rare pathology. Head and neck involved only in 15-20% of all sarcomas cases. Local relapse is the main reason of cure fails in patients (pts) with sarcomas of the skull base. In this link forced local control is the corner stone of successful treatment. 81 pts with different types of sarcomas of the skull base treated at our clinic during the last 30 years. Pts age varied between 13-80 years. The majority of soft tissue sarcomas ($n=44$) consisted of tumors located in infratemporal fossa – 50% ($n=22$) and paranasal sinuses – 34,1% ($n=15$). Of bone sarcomas it were maxilla – 38,5% ($n=15$), ethmoid bone - 20,5% ($n=8$) and mandibula with second involvement of infratemporal fossa - 12,8% ($n=5$). The main morphological types of soft tissue sarcomas were – rhabdomyosarcoma (29,5%, $n=13$), malignant schwannoma (22,7%, $n=10$) and malignant fibrous histiocytoma (18,2%, $n=8$). In a group of bone sarcomas they were – osteosarcoma (29,7%, $n=11$) and chondrosarcoma (24,3%, $n=9$). Previously untreated cases diagnosed in 68 pts and 13 pts had recurrence sarcomas. The majority of cases consisted of advanced tumors in the limits of the skull base. Cure tactic in a study group depends on several factors: tumor morphology, tumor volume and chemoradio sensitivity.

The main treatment choice was surgery (70%, n=56) alone or in combination with chemoradiotherapy (32,1%). 22(27,5%) pts had conservative treatment course. Different types of surgical approaches were used for tumor removal: trans-facial resections (n=32), combined craniofacial resections (n=6), resections of the lateral skull base (n=16), posterior skull base approaches (n=2). The most favorable 5-year overall survival rate was pointed out for a soft tissue sarcomas – 33,2% (median 13,1 months) vs 16,5% (median 14 months) for a group of bone sarcomas ($p>0,05$). 5-year overall survival rate for embryonal type of rhabdomyosarcoma was 24,3% (median 13,5 months), chondrosarcoma – 23,5% (median 23 months). The worse results were pictured for malignant schwannoma, osteosarcoma and Ewing/PNET sarcomas where none of the pts over-live 5 year period. Pts with chemoradiotherapy had little improvement in a group of soft tissue sarcomas. For example, local recurrence rate was similar for both groups with or without chemoradiotherapy – 68,7% vs 66,7%. Same trend was outlined for 5-year survival rate – 31,2% vs 33,3% ($p>0,1$). Surgery had benefit vs conservative treatment in a group of bone sarcomas, for example, recurrence rate was significantly lower in a first pts group – 67,9% vs 87,5% ($p=0,01$). Chemoradiotherapy had not any benefits in treatment of bone sarcomas, so 5-year overall survival rate was most favorable in a group of surgical cure – 23% (median 16,5 months) in comparison with conservative (6,3%, median 16 months) and complex treatment (0%, median 12 months) ($p=0,1$). Total tumor resection was the main prognostic factor associated with better outcome. Local recurrence rate was significantly higher in a group of unradical operations – 73,3% vs 51,2% (radical surgery) ($p=0,02$). Among factors associated with negative prognosis were – recurrence tumors, primary regional node involvement, tumor spread into the cavernous sinus, primary tumor involvement of the posterior skull base or combined destruction of anterior and lateral skull base. Embryonal rhabdomyosarcoma and chondrosarcoma associated with the most favorable follow-up. Chemoradiotherapy doesn't improve outcome for bone sarcomas and malignant schwannoma of the skull base. On the other hand chemoradiotherapy can potentially decrease local recurrence rate in a group of soft tissue sarcomas. Surgery appears to be a method of choice in a treatment of the majority of skull base sarcomas, especially of bone sarcomas, residual and chemoradioresistant tumors.

Key words: sarcomas, skull base, surgery, chemotherapy, radiotherapy.

Введение

Саркомы составляют 1 % всех злокачественных опухолей человека. Большинство из них (80 %) являются мягкоткаными, реже (20 %) – костными. Саркомы головы и шеи составляют 15–20 % всех сарком, чаще всего они локализованы в придаточных пазухах полости носа и на шее. При этом 80 % сарком этой локализации реализуются у взрослых пациентов и 20 % у детей [1; 4].

Большинство сарком головы и шеи представлены местно-распространенными опухолями. Для них характерно особенное клинико-биологическое поведение. Регионарные метастазы реализуются всего в 10–15 % случаев, в основном при низкодифференцированных формах опухолей. В отсутствии клинических признаков регионарных метастазов отдаленные метастазы встречаются редко на момент постановки диагноза. Чаще всего отдаленные метастазы реализуются в легких, затем в печени и костях. Основной причиной неудач в лечении сарком головы и шеи в настоящее время является частое развитие местных рецидивов после проведенного лечения [3; 4].

В лечении большинства сарком основным методом является хирургический; химиотерапия и лучевая терапия являются дополняющими и применяются в основном после нерадикальных хирургических вмешательств. В тоже время вопрос о необходимости проведения химиолучевой терапии зависит в большей мере от степени дифференцировки саркомы. Так низкодифференцированные варианты сарком требуют применения агрессивных химиотерапевтических схем с целью эрадикации системных микрометастазов [5].

Большинство авторов сходятся во мнении, что удаление сарком должно сопровождаться формированием широкого блока в пределах здоровых тканей. При этом существуют и исключения, например, хирургические вмешательства при эмбриональной рhabdomyosarcome, особенно в детском возрасте, в большинстве случаев в связи с распространенностью процесса, не являющихся радикальными, а прогноз не определяется объемом выполненного вмешательства [9].

Принимая во внимание тот факт, что хирургический метод остается доминирующим в лечении сарком, необходимо понимать важность тщательно-

го дооперационного планирования объема удаляемых тканей [2]. При этом в ряде случаев при поражении основания черепа невозможно выполнить радикальное вмешательство из-за вовлечения в опухолевый процесс жизненно важных структур, в связи с чем часто требуется дополнительное проведение лучевой терапии (в до- или после-операционном периоде). Применение послеоперационной лучевой терапии в частности при синовиальной саркоме позволяет снизить частоту реализации местных рецидивов с 60–90 до 28–49 %. Доза лучевой терапии при этом должна превышать 65 Гр [4; 6; 7; 8].

При обсуждении тактики лечения низкодифференцированных сарком, которые часто на момент постановки диагноза имеют значительные (> 5 см) размеры, необходимо учитывать высокую вероятность наличия микрометастазов в системном кровотоке. В связи с этим встает вопрос необходимости применения системной ХТ дополнительно к лучевой терапии. Для некоторых видов сарком химиолучевая терапия достоверно снижает частоту реализации местных рецидивов и отдаленных метастазов, увеличивает выживаемость. Так использование ПХТ в комбинации с ЛТ при саркоме Юинга увеличивает 5-летний выживаемость с 10 до 50–75 % в основном за счет эрадикации микроскопических остаточных опухолевых очагов [4].

Материалы и методы

В клинике опухолей верхних дыхательно-пищеварительных путей за последние 30 лет накоплен опыт лечения 81 пациента с различными формами сарком, сопровождающихся поражением разных отделов основания черепа. Основным критерием включения пациентов в исследуемую группу являлось наличие опухолевого поражения в области основания черепа или его разрушение с распространением опухоли в полость черепа. Следует отметить, что большинство подобных опухолей, как правило, достигают выраженного объема, прежде чем вызывает поражение непосредственно основания черепа. Возрастной состав пациентов в исследуемой группе колебался от 13 до 80 лет. Распределение пациентов в группе мягкотканых сарком (n=44) в соответствии с первичной локализацией опухолевого поражения выглядело следующим образом.

Злокачественная фиброзная гистиоцитома (ЗФГ) в большинстве случаев локализовалась в области верхнечелюстной пазухи – 62,5 % (n=5), реже в области подвисочной ямки – 37,5 % (n=3). Практически все случаи синовиальной (n=3) и веретеноклеточной сарком (n=3) первично исходили из тканей подвисочной ямки, тоже относилось к одному случаю светлоклеточной саркомы (сухожилий и апоневрозов). В группу мягкотканых сарком кроме перечисленных новообразований также вошли: эмбриональная – 9 и альвеолярная – 4 рабдомиосаркомы, ангиосаркома – 3, липосаркома – 2 и злокачественная шваннома – 10. Оба варианта рабдомиосарком чаще всего (76,9 %) встречались в области полости носа и придаточных пазух, лишь в трех случаях эмбриональная рабдомиосаркома первично локализовалась в области мягких тканей подвисочной и височной ямок. Ангиосаркома напротив, чаще встречалась в области подвисочной ямки 66,7 % (n=2) и реже в полости носа 33,3 % (n=1). Два случая липосарком первично исходили из мягких тканей лица. Злокачественная шваннома в большинстве случаев (70 %) локализовалась в области подвисочной ямки, что объясняется преимущественным расположением нервных структур в указанной области, в двух случаях (20 %) злокачественная шваннома исходила непосредственно из верхней челюсти. Следует отметить, что все варианты мягкотканых сарком были представлены распространенными формами опухолей, которые сопровождалась инфильтративным ростом и комбинированным поражением структур наружного основания черепа.

Костные саркомы (n=37) были представлены различными вариантами первичных костных сарком и сарком с атипичным развитием в костях. К первой группе относятся: остеосаркома – 11, в т.ч. паростальный вариант – 1 и остеосаркома, развившаяся из фиброзной дисплазии – 1, хондросаркома – 9, хордома – 4, саркома Юинга – 4 и примитивная нейроэктодермальная опухоль (ПНЭО) – 4. Вторую группу составили костные формы мягкотканых сарком, среди них: лейомиосаркома – 2, злокачественная шваннома – 2, фибросаркома – 1. Большинство костных сарком поражающих основание черепа первично исходили из структур лицевого скелета (71,8 %), в их числе: верхняя челюсть – 38,5 % (n=15), решетчатая кость – 20,5 % (n=8) и нижняя челюсть с поражением подвисочной ямки – 12,8 % (n=5). Реже саркомы поражали костные структуры непосредственно основания черепа (23,1 %), такие как: височная кость – 5,1 % (n=2), основная кость – 5,1 % (n=2), затылочная кость – 2,6 % (n=1), область сфеноокципитального перехода – 10,3 % (n=4).

Детальный анализ частоты поражения передних и средних отделов основания черепа демонстрирует, что саркомы не проявляют избирательной тропности к какому-либо отделу основания черепа, так как частота поражения передних и средних отделов незначительно различалась в двух группах – 39,5 и 43,2 % соответственно.

При этом саркомы отличались самой низкой частотой распространения за пределы одного отдела основания черепа в сравнении с другими видами злокачественных опухолей – 13,6 %, что, объясняется экспансивным характером роста и более локализованным поражением основания черепа.

Распространение опухоли в полость черепа извне, с поражением твердой мозговой оболочки значительно усложняет выполнение хирургических вмешательств в области основания черепа и часто приводит к ухудшению клинического прогноза. Анализ частоты развития подобного состояния в исследуемой группе

пациентов демонстрирует следующие результаты. Общая частота распространения всех видов сарком за пределы костного барьера в полость черепа составила 17,2 %. Однако при более подробном изучении этот показатель оказался подверженным резким колебаниям в разных морфологических группах: для примитивной нейроэктодермальной опухоли – 75 %, остеосаркомы – 54,5 %, саркомы Юинга и эмбриональной рабдомиосаркомы – 25 и 22,2 %, соответственно. Самой низкой частота интракраниального распространения оказалась в группе хондросаркомы – 11,1 %.

Интересно, что среди мягкотканых сарком достаточным потенциалом к интракраниальному распространению обладали только эмбриональная рабдомиосаркома и ангиосаркома, а среди хордом не было ни одного случая проникновения в полость черепа, несмотря на выраженные костно-деструктивные изменения в области наружного основания черепа.

В группе наиболее агрессивных процессов, поражающих сразу несколько отделов основания черепа отмечалось пятикратное увеличение потенциала к интракраниальному распространению (58,3 %). Таким образом, определялась прямая корреляционная зависимость между размерами опухолевого поражения основания черепа и частотой проникновения опухоли в полость черепа.

Первичные саркомы имелись у 68 пациентов, рецидивные – у 13. Все первичные мягкотканые саркомы (n=37) имели размеры более 5 см в наибольшем измерении и поражали центральные отделы черепа. Следует также отметить, что практически все варианты мягкотканых сарком в исследуемой группе были представлены низкодифференцированными вариантами опухолей (2–3 ст. злокачественности). При этом преобладали распространенные формы рабдомиосаркомы – 29,5 % (n=13), злокачественной шванномы – 22,7 % (n=10) и злокачественной фиброзной гистиоцитомы – 18,2 % (n=8).

Большинство костных сарком (64,9 %) сопровождалось распространением за пределы костных футляров и обладали низкой степенью дифференцировки (2–3 ст). Высокой степенью дифференцировки отличались только хордомы, причем в большинстве случаев (75 %) они были представлены распространенными вариантами опухолей.

Метастазы сарком в регионарные лимфатические узлы до начала лечения наблюдались всего у 5 пациентов (общая частота – 6,2 %). Эти случаи были представлены мягкоткаными саркомами (рабдомиосаркома, n=4, и ангиосаркома подвисочной ямки, n=1).

Общая частота отдаленного метастазирования у первичных больных среди сарком составила 2,5 % (n=2). В одном случае солитарный метастаз локализовался в легком у пациента с остеосаркомой решетчатой кости (9,1 %), в другом случае обнаружены множественные метастазы в легких и печени у пациента с злокачественной шванномой (10 %).

Тактика лечения в исследуемой группе зависела от нескольких факторов: морфологии опухоли, распространенности опухолевого процесса, чувствительности к химио- и лучевой терапии. Большинству пациентов проведено хирургическое вмешательство (70 %, n=56), при этом в 32,1 % случаев операции комбинировались с лучевой и химиотерапией. Консервативное лечение получили 22 (27,5 %) пациента.

В группе мягкотканых сарком хирургическое лечение получили 63,6 % (n=28) пациентов, лучевая и химиотерапия в этих случаях применялась в 42,9 % случаев.

В 14 (31,8 %) случаях была проведена лучевая терапия по радикальной программе, в 57 % случаев из них в комбинации с химиотерапией.

В группе костных сарком значительно преобладало количество оперированных больных (77,8 %, $n=28$). При этом 39 % ($n=11$) из них получили дополнительно химиотерапию и 21,4 % ($n=6$) лучевую терапию. 8 (22,3 %) пациентов получили лучевую терапию в самостоятельном варианте и в комбинации с химиотерапией.

Всего химиотерапия в группе костных сарком проведена 43,2 % пациентов ($n=16$), в группе мягкотканых сарком в 31,8 % ($n=14$) случаев.

Для удаления сарком вызывающих поражение основания черепа мы использовали различные варианты хирургических вмешательств.

Резекция верхней челюсти на стороне поражения с мобилизацией решетчатого лабиринта вместе с решетчатой пластинкой вплоть до основной пазухи выполнена 9 пациентам с распространенными формами костных и 8 – мягкотканых сарком с комбинированным поражением лицевого скелета, придаточных пазух и основания черепа.

Расширенный вариант трансфациального вмешательства с резекцией практически половины лицевого скелета и мобилизацией тканей подвисочной ямки выполнен 5 пациентам с первичными костными саркомами костей лицевого скелета (верхней и нижней челюсти). Реже встречались мягкотканые саркомы, требующие подобного рода комбинированной резекции структур лицевого скелета и основания черепа – 2 случая. При поражении тканей орбиты передние доступы комбинировались с экзентерацией глазницы – 8 случаев.

Опухоли придаточных пазух полости носа, имеющие тенденцию к более выраженному интракраниальному распространению, требовали использования комбинированного *краниофациального* доступа. В этой группе преобладали случаи костных сарком первично исходящих из решетчатой кости – 6 случаев.

Трансцервикальный доступ использовался для удаления сарком с ограниченным поражением тканей подвисочной ямки (синовиальная саркома, хордома, злокач.шваннома, ЗФГ) – 10 случаев.

При более распространенных процессах в области подвисочной ямки применялся трансмандибулярный и субтемпоральный преаурикулярный доступы. В первом случае преобладали распространенные формы сарком, локализованные в области подвисочной ямки ($n=3$). Во втором случае преобладали саркомы с преимущественным распространением в область средней черепной ямки ($n=2$).

Субокципитальный парамедианный доступ использовался в 2 случаях при локализации процесса в области кранио-цервикального перехода. При этом морфологический ряд был представлен распространенными формами хордомы и злокачественной шванномы.

Результаты

Многие виды сарком, поражающих основание черепа, являются высокочувствительными к химио- и лучевой терапии, что позволяет использовать указанные методы в комплексном лечении злокачественных процессов этой локализации. Эффективность химио- и лучевой терапии оценивалась нами в первую очередь по непосредственным результатам, т.е. частоте регрессий опухолей после проведения того или иного вида лечения.

Высокочувствительными к проводимой терапии, т.е. ситуация, когда в подавляющем большинстве случаев наблюдалась выраженная регрессия первичного очага (более 50 % или полная регрессия), оказались: ангиосаркома (100 %), хондросаркома (100 %), ПНЭО/саркома Юинга (60 %), эмбриональная рабдомиосаркома (80 %). Крайне низкой эффективность лечения была в группах злокачественной фиброзной гистиоцитомы и злокачественной шванномы. Самые высокие показатели непосредственной эффективности лучевой/химиолучевой терапии после проведения радикальных доз лучевой терапии (свыше 60 Гр) наблюдались в группах: эмбриональной рабдомиосаркомы (100 %), ангиосаркомы (100 %) и хондросаркомы (100 %).

Анализ отдаленных результатов в каждой морфологической группе демонстрирует следующие результаты.

Местные рецидивы чаще всего возникали у пациентов в группе сарком Юинга/ПНЭО – 100 %, злокачественной шванномы – 83,3 %, хондросаркомы – 77,8 %.

Самые низкие показатели местного рецидивирования регистрировались в группах остеосаркомы – 50 % и эмбриональной рабдомиосаркомы – 55,6 %.

Чаще всего регионарное метастазирование после проведенного лечения наблюдалось в группе злокачественной шванномы – 8,3 %. Самый низкий показатель регионарного метастазирования отмечался в группе костных сарком – 2,8 %.

Отдаленные метастазы после окончания основного лечения чаще регистрировались в группе остеосаркомы – 12,5 % и злокачественной шванномы – 8,3 %. В группах эмбриональной рабдомиосаркомы, хондросаркомы и сарком Юинга/ПНЭО вообще не зарегистрировано ни одного случая отдаленного метастазирования за весь период наблюдения после окончания лечения.

Самые высокие показатели общей 5-летней выживаемости были зарегистрированы в группе мягкотканых сарком – 33,2 % (медиана 13,1 мес.), против 16,5 % (медиана 14 мес.) в группе костных сарком, различие не достоверно. Общая 5-летняя выживаемость в группе эмбриональной рабдомиосаркомы составила – 24,3 % (медиана 13,5 мес.), в группе хондросаркомы – 23,5 % (медиана 23 мес.). Самые низкие показатели общей 5-летней выживаемости были отмечены в группах злокачественной шванномы, остеосаркомы и саркомы Юинга/ПНЭО, где ни один пациент не пережил указанного срока.

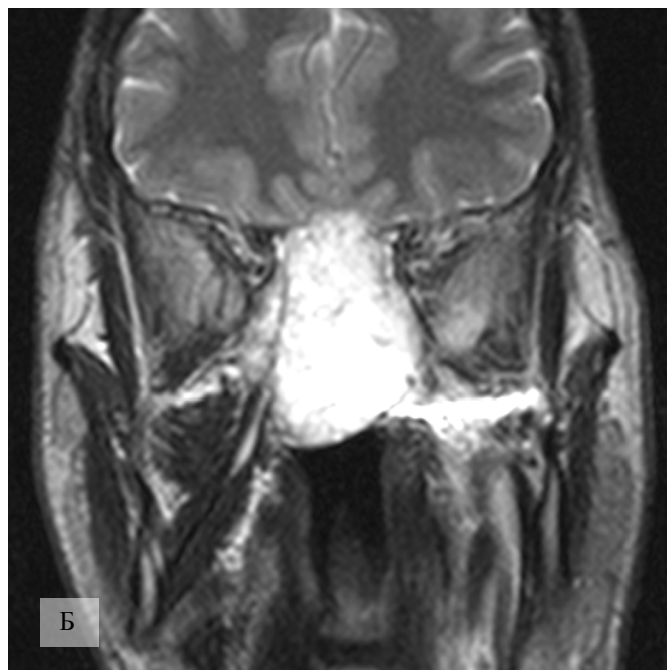
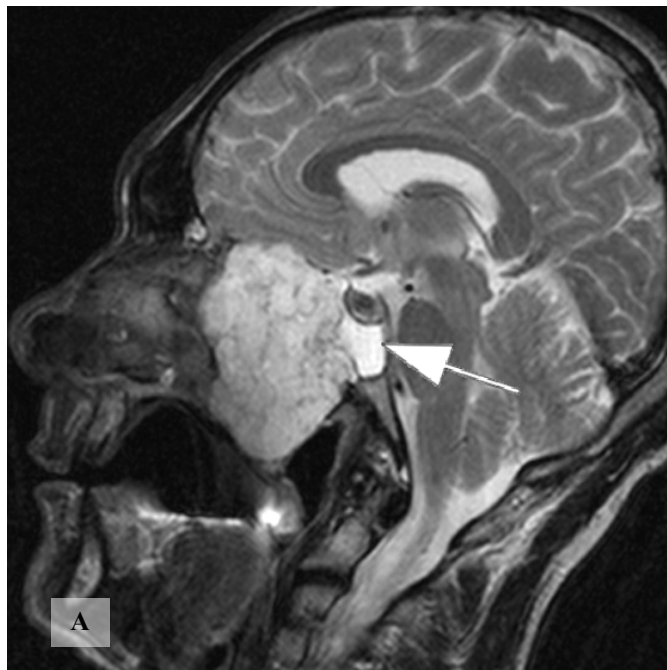
При оценке влияния различных терапевтических методик на отдаленные результаты лечения сарком были получены следующие показатели. Проведение химиолучевой терапии приводило к незначительному улучшению отдаленных результатов в группе мягкотканых сарком (табл. 1). Исключением стали пациенты со злокачественной шванномой, общая летальность для которой составила 83,3 %, при отсутствии даже незначительных улучшений результатов лечения при подключении химиолучевой терапии. Следует отметить, что увеличение дозы лучевого воздействия в группе мягкотканых сарком оказывало определенное влияние на результаты лечения.

Так общая 5-летняя выживаемость в группе пациентов получивших радикальные дозы лучевой терапии значительно превосходила аналогичный показатель в группе пациентов, которым лучевая терапия была проведена в дозах ниже 60Гр – 36,1 % (медиана не достигнута) и 16,1 % (медиана 16,5 мес.) соответственно, различие не достоверно ($p=0,84$).

Рисунок к статье А.М. Мудунова

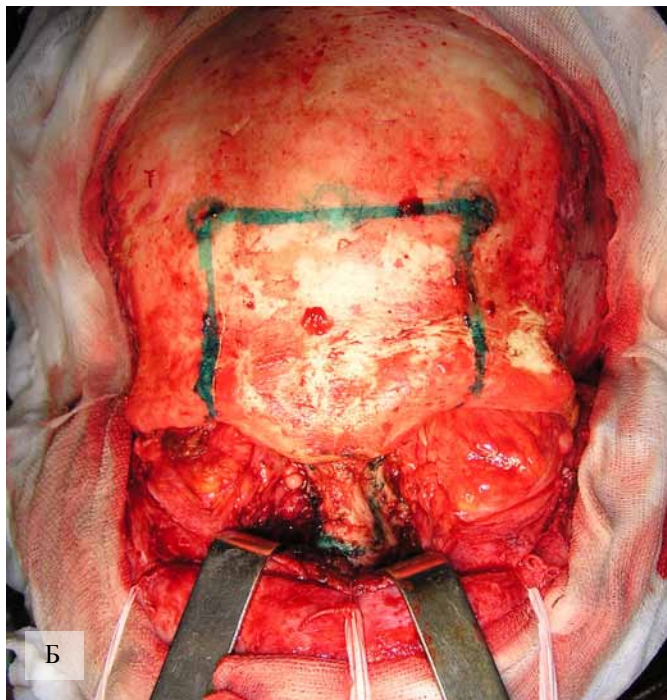
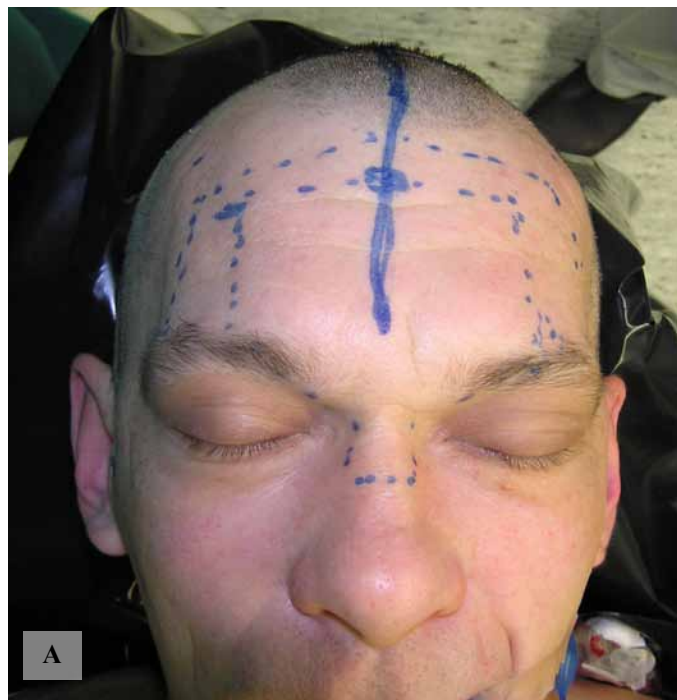
**«ВЫБОР ТАКТИКИ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С САРКОМАМИ ОСНОВАНИЯ ЧЕРЕПА:
ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ»**

Пациент 41 года, хондросаркома сошника с поражением основания черепа, распространением опухоли в область передней черепной ямки, полость носа с обеих сторон, носоглотку.



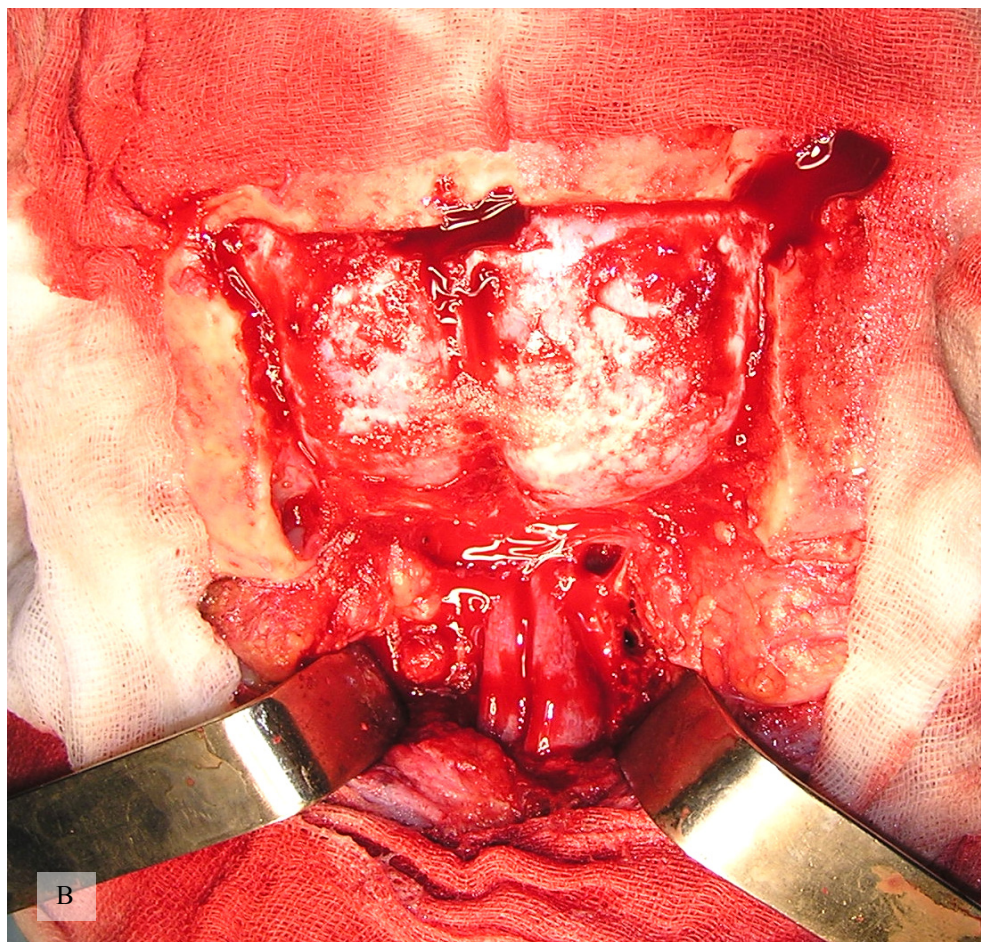
I. МРТ–визуализация. В основной пазухе реактивный выпот (стрелка).

- А. Фронтальная проекция.
- Б. Сагиттальная проекция.

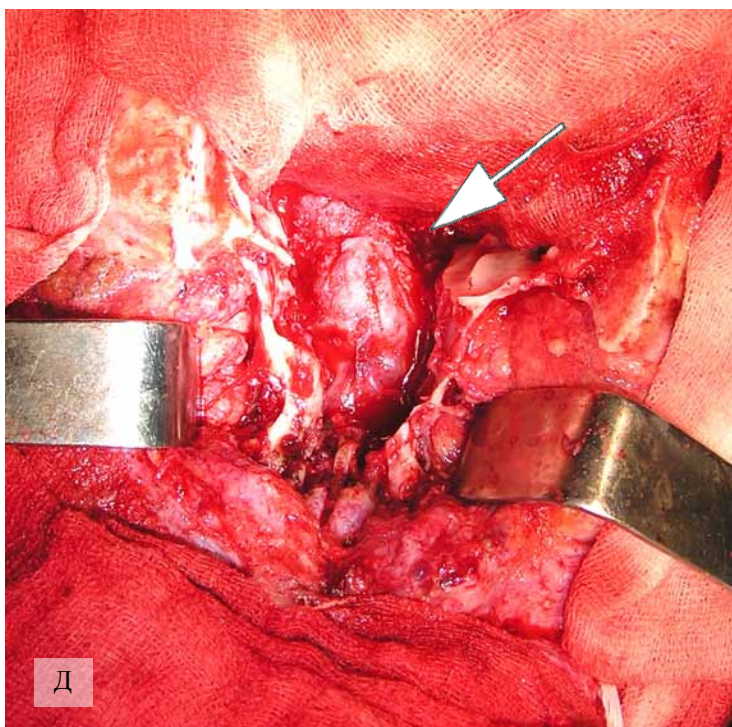
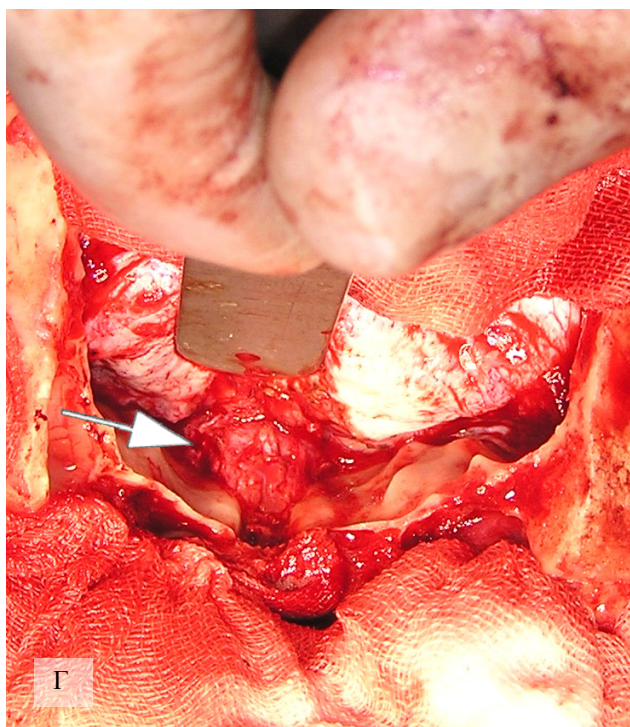


II. Интраоперационные снимки.

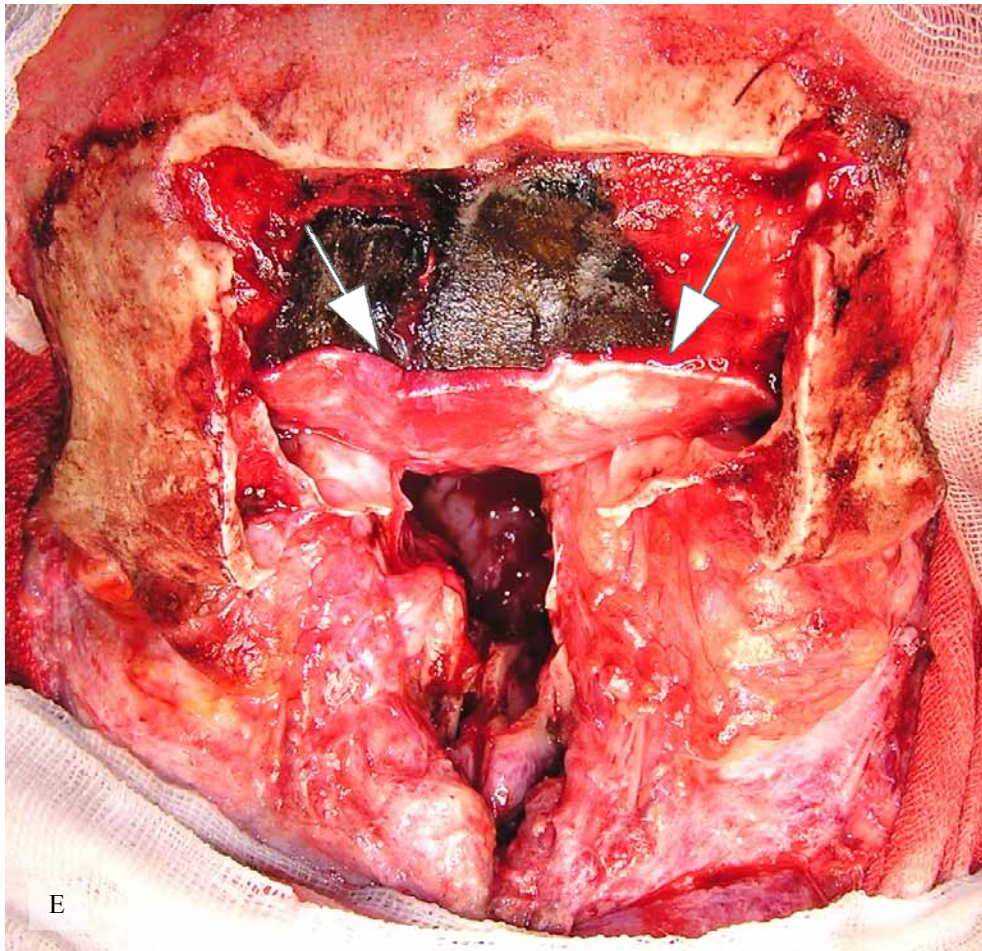
- А. Намечены границы краниотомного доступа к переднему отделу основания черепа.
- Б. Кожно-апоневротический лоскут с головы мобилизован максимально книзу до уровня грушевидного отверстия, глазные яблоки смещены книзу с сохранением надглазничных сосудисто-нервных пучков, намечены границы краниотомии с выкраиванием костно-пластического лоскута для осуществления субкраниального доступа.



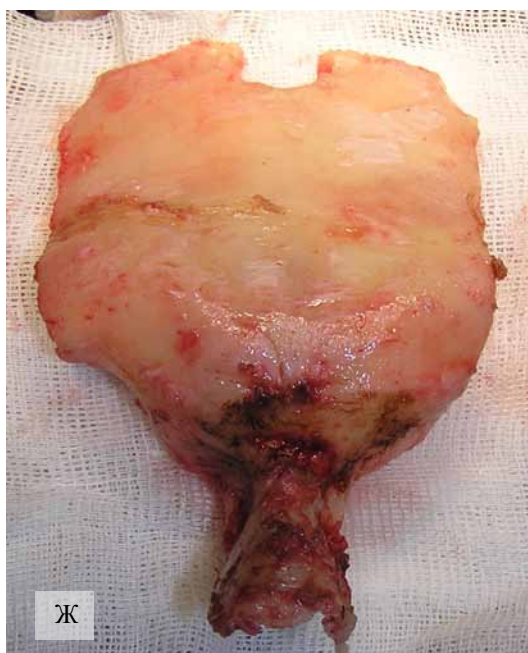
В. Выполнена краниотомия, обнажена твердая мозговая оболочка передней черепной ямки и слизистая оболочка верхних отделов полости носа.



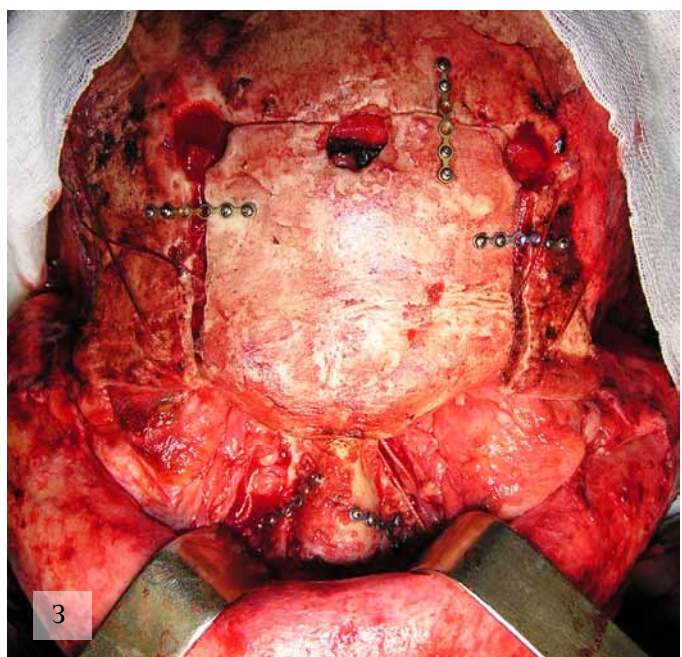
Г. Мобилизована твердая мозговая оболочка передней черепной ямки с обнажением интракраниального компонента опухоли (указан стрелкой), опухоль врастает в твердую мозговую оболочку.
 Д. Мобилизована передняя поверхность опухоли (указана стрелкой).



Е. Выполнено удаление опухоли с резекцией центрального отдела передней черепной ямки вместе с пораженным участком твердой мозговой оболочки, дефект оболочки замещен фасциальным лоскутом с бедра, дополнительно зона дефекта укрыта дубликатурой широкого лоскута фасции с бедра (указан стрелками). Темные участки гемостатическая губка.



Ж



З

- Ж. Костный носо-лобно-глазничный пластический лоскут, который сохраняется для восстановления контуров лица.
 З. Костно-пластический лоскут фиксирован на место с помощью титановых микроштифтов.



III. Внешний вид пациента после ушивания раны, восстановлены контуры лица, выполнена репозиция глазных яблок.

Рисунки к статье Н.Ю. Анисимовой

«НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИСТИРОЛА, СПОСОБНЫЕ ЭЛИМИНИРОВАТЬ МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ КРОВИ»

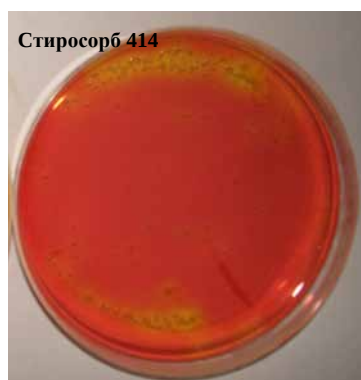
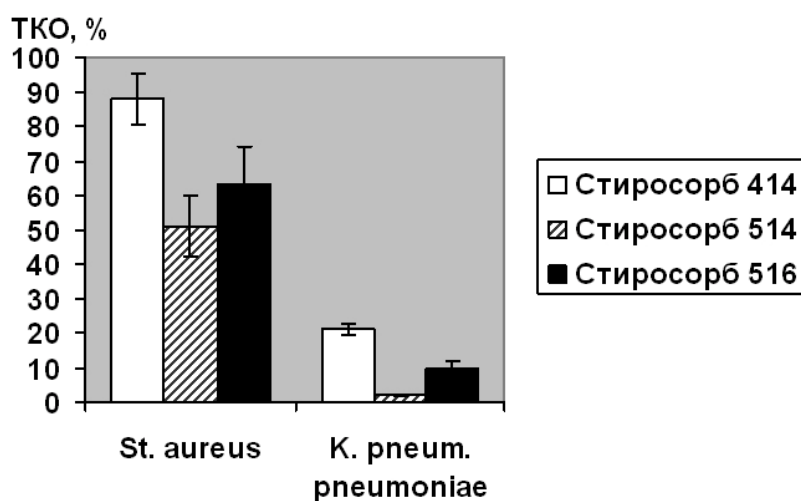


Рис. 1. Интенсивность колониобразования культуры *S. aureus* на маннит-солевом агаре до (контрольная серия) и после гемосорбции. Степень желтого окрашивания среды напрямую коррелирует с количеством колониобразующих единиц.

Рис. 2. Торможение колониобразования гемокультуры после гемосорбции (ТКО, %).



**ИНГИБИТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ:
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ**

63. Oak M.H. et al. Red wine polyphenolic compounds inhibit WEGF expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway//Arterioscler Thromb. Vasc Biol. – 2003. – 23. – P. 1001–7.
64. Ohsumi K., Nakagawa R., Fukuda Y. et al. New combretastatin analogues effective against murine solid tumors: design and structure-activity relationship // J Med Chem. – 1998. – 41. – P. 705–06.
65. Okamoto T., Yamagishi S., Inagaki Y. et al. Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin // FASEB J. – 2002. – 16. – P. 1928–30.
66. Osada M., Imaoka S., Funae Y. Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1 α protein // FEBS Lett. – 2004. – 575. – P. 59–63.
67. Park A.M., Dong Z. Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols // J Biochem Mol Biol. – 2003. – 36. – P. 66–77.
68. Peng S.Y., Norman J., Curtin G. et al. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, acemannan // Mol. Biother. – 1991. – 3. – P. 79–87.
69. Pettit G.R., Rhodes M.R. Antineoplastic agents 389. New syntheses of the combretastatin A-4 prodrug // Anticancer Drug Des. – 1998. – 13(3). – P. 183–91.
70. Pettit G.R., Singh S.B., Boyd M.R. et al. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5 and A-6 // J Med Chem. – 1995. – 38. – P. 1666–72.
71. Pettit G.R., Singh S.B., Niven M.L. et al. Isolation, structure, and synthesis of combretastatins A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from Combretum caffrum//J. Nat. Prod. – 1987. – 50. – P. 119–20.
72. Radzikowski C., Wietrzyk J., Gryniewicz G. et al. Genistein: a soy isoflavone revealing a pleiotropic mechanism of action - clinical implications in the treatment and prevention of cancer//Postepy Hig Med Dosw (Online). – 2004. – 58. – P. 128–39.
73. Ramos M.A., Kuzuya M., Esaki T. et al. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1998. – 18. – P. 1188–96.
74. Rao K., McBride T.J., Oleson J.J. Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent//Cancer Res. – 1968. – 28. – P. 1952–4.
75. Ravindranath M.H., Muthugounder S., Presser N. et al. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein // Adv Exp Med Biol. – 2004. – 546. – P. 121–65.
76. Sartippour M.R., Heber D., Henning S. et al. cDNA microarray analysis of endothelial cells in response to green tea reveals a suppressive phenotype // Int J Oncol. – 2004. – 25. – P. 193–202.
77. Sartippour M.R. et al. Inhibition of fibroblast growth factors by green tea//Int. J. Oncol. – 2002. – 21. – P. 487–91.
78. Sartippour M.R. et al. Rabdosia rubescens inhibits breast cancer growth and angiogenesis//Int. J. Oncol. – 2005. – 26. – P. 121–7.
79. Sato K., Mochizuki M., Saiki I. et al. Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of Panax ginseng, ginsenoside-Rb2 // Biol. Pharm. Bull. – 1994. – 17. – P. 635–9.
80. Sen C.K., Khanna S., Gordillo G. et al. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm // Ann. N.-Y. Acad. Sci. – 2002. – 957. – P. 239–49.
81. Sengupta S., Toh S.A., Sellers L.A. et al. Modulating angiogenesis: the yin and the yang in ginseng // Circulation. – 2004. – 110. – P. 1219–25.
82. Sharma R.A., Euden S.A., Platton S.L. et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance // Clin Cancer Res. – 2004. – 10. – P. 6847–54.
83. Shim J.S., Kim J.H., Cho H.Y. et al. Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin // Chem Biol. – 2003. – 10. – P. 695–704.
84. Tang F.Y., Nguyen N., Meydani M. Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis in vitro through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of Akt molecule // Int J Cancer. – 2003. – 106. – P. 871–8.
85. Tseng S.H., Lin S.M., Chen J.C. et al. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats // Clin Cancer Res. – 2004. – 10. – P. 2190–202.
86. Wang S., Zheng Z., Weng Y. et al. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts // Life Sci. – 2004. – 74. – P. 2467–78.
87. Wartenberg M., Budde P., De Marees M. et al. Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation cultures of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional chinese medicine//Lab Invest. – 2003. – 83. – P. 87–98.
88. Witek-Zawada B., Koj A. Regulation of expression of stromelysin-1 by proinflammatory cytokines in mouse brain astrocytes // J Physiol Pharmacol. – 2003. – 54. – P. 489–96.
89. Wu L.W., Chiang Y.M., Chuang H.C. et al. Polyacetylenes function as anti-angiogenic agents//Pharm Res. – 2004. – 21. – P. 2112–9.
90. Yamakawa S., Asai T., Uchida T. et al. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor angiogenesis // Cancer Lett. – 2004. – 210. – P. 47–55.
91. Yarbrow J.W. The scientific basis of cancer chemotherapy. In: Perry MC, ed. The Chemotherapy Source Book. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992. – P. 2–14.
92. Zhang D., Botos I., Gomis-Ruth F.X. et al. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrollysine C (from d) // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – 91. – P. 8447–51.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



В группе костных сарком не было отмечено выраженного влияния указанного фактора на отдаленные результаты лечения. Интересно отметить, что в двух случаях неоперабельных хондросарком после проведения лучевой терапии в дозах свыше 60 Гр была достигнута частичная опухолевая регрессия с ремиссией в течении 7 и 3 лет. В обоих случаях опухоли имели 2 степень анаплазии. Вероятно, этот вид опухоли все-таки обладает определенной чувствительностью к лучевому воздействию, которая проявляется на более высоких дозах. Наличие операции в общем лечебном плане не приводило к улучшению показателей безрецидивного течения и выживаемости в группе мягкотканых сарком (табл. 2). В то же время следует отметить, что хирургическое вмешательство является неотъемлемой частью лечения опухолей резистентных к проведению химиолучевой терапии.

В группе костных сарком наоборот наблюдалось значительное снижение частоты местного рецидивирования у оперированных пациентов – 67,9 % в сравнении с неоперированными – 87,5 % (табл. 2). Следует отметить, что группа костных сарком основания черепа также отличалась тем, что подключение химиолучевой терапии к операции не приводило к улучшению отдаленных результатов лечения (табл. 1).

Основным фактором значительного улучшения отдаленных результатов лечения в исследуемой группе являлась радикальность хирургического вмешательства, т.е. удаление опухоли в пределах здоровых тканей. Так частота реализации местных рецидивов в группе пациентов с радикальными хирургическими вмешательствами значительно превосходила аналогичный показатель среди пациентов, которым было выполнено радикальное удаление опухоли – 73,3 % и 51,2 % соответственно ($p=0,02$). В свою очередь это привело к улучшению общей 5-летней выживаемости в группе пациентов с радикальными хирургическими вмешательствами до 35,3 % в сравнении с аналогичным показателем среди пациентов с нерадикальными вмешательствами – 21 % ($p<0,01$).

Факторами, достоверно ухудшающими отдаленные результаты лечения, оказались следующие: наличие рецидивной опухоли в области основания черепа, первичное поражение регионарных лимфоколлекторов, поражение кавернозного синуса, первичное поражение заднего отдела и комбинированное поражение переднего и среднего отделов основания черепа (табл. 3).

Обсуждение

Наиболее благоприятным течением среди сарком, поражающих основание черепа, по показателям безрецидивного течения и выживаемости обладают эмбриональная рабдомиосаркома и хондросаркома.

В группе мягкотканых сарком прослеживается влияние эскалации дозы ЛТ (свыше 60 Гр) на отдаленные результаты лечения в сторону их улучшения. Также существует вероятность снижения частоты местного рецидивирования хондросарком при проведении лучевой терапии в дозах, превышающих этот уровень.

Лучевая/химиолучевая терапия не оказывает влияние на отдаленные результаты лечения большинства костных сарком и злокачественной шванномы, поражающих основание черепа. В то же время они имеют потенциальную возможность снижения частоты местного рецидивирования в группе мягкотканых сарком.

Проведение агрессивного лучевого или химиолучевого лечения в группе сарком основания черепа является обоснованной тактикой, так как в большинстве случаев при таких опухолях как эмбриональная рабдомиосаркома, ПНЭО, хондросаркома, ангиосаркома подобный подход позволяет добиться выраженного противоопухолевого эффекта.

Хирургическое вмешательство является основным составным компонентом в лечении сарком, поражающих основание черепа.

Включение операции в лечебный план значительно улучшает отдаленные результаты лечения в группе костных сарком.

В то же время влияние указанного фактора неоднозначно в группе мягкотканых сарком, в связи с чем, операция является методом выбора в лечении остаточных и резистентных опухолей указанного морфологического ряда.

Факторами, значительно ухудшающими результаты лечения у больных с опухолевым поражением основания черепа, являются: наличие рецидивной опухоли, поражение регионарных лимфоколлекторов до начала основного лечения, поражение кавернозного синуса, локализация поражения в области заднего отдела основания черепа, комбинированное поражение сразу нескольких отделов основания черепа.

Таблица 1

Зависимость отдаленных результатов лечения от проведения химиолучевой терапии в группах костных и мягкотканых сарком

Саркомы	Частота местного рецидивирования	5-летняя выживаемость	p
Костные	58,8 % ➔ 81,8 %	23 % ➔ 0 %	0,1
Мягкотканые	68,7 % ➔ 66,7 %	31,2 % ➔ 33,3 %	>0,1

Вторая колонка цифр – пациенты с химиолучевой терапией. (log-rank test, t Стьюдент)

Таблица 2

Зависимость отдаленных результатов лечения от включения в план хирургического вмешательства

Саркомы	Частота местного рецидивирования	5-летняя выживаемость	р
Костные	87,5 % → 67,9 %	6,3 % → 23 %	p=0,1
Мягкотканые	50 % → 32,1 %	50 % → 32 %	p>0,1

первая колонка цифр – пациенты без операций. (log-rank test, t Стьюдент)

Таблица 3

Факторы, ухудшающие отдаленные результаты лечения сарком поражающих основание черепа

Поражение	Частота местного рецидивирования	5-летняя выживаемость	р
Рецидивная опухоль	55,7 % → 83,3 %	33,2 % → 7,9 %	p=0,001
Первичное поражение регионарных лимфоколлекторов	7,9 % → 19,1 %*	40 % → 11,5 %	p=0,045
Поражение кавернозного синуса	58,3 % → 85,7 %	44,9 % → 38,8 %	p=0,06
Первичное поражение заднего отдела основания	58,7 % → 100 %	31 % → 0 %	p=0,03
Комбинированное поражение переднего и среднего отделов основания	62,2 % → 79,6 %	37,6 % → 11,2 %	p=0,03

*Первая колонка цифр – пациенты без указанного фактора. (log-rank test, t-Стьюдент)

Литература

1. Dennis H. Kraus. Sarcomas of the Head and Neck // Current Oncology Reports. – 2002. – 4. – P. 68–75.
2. Giuliano A.E. The rationale for planned reoperation after unplanned total excision of soft tissue sarcomas // J Clin Oncol. – 1985. – 3. – P. 1344–8.
3. Gustafson P. Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients // Acta Orthop Scand Suppl. – 1994. – 259. – P. 1–31.
4. McMains K. Christopher. «Pathology: Sarcomas of the Head and Neck.» eMedicine. 16 10 2007 г. <http://www.emedicine.com/ent/topic675.htm> (дата обращения: 09 01 2008 г.).
5. Patel S.G., Shaha A.R., Shah J.P. Soft tissue sarcomas of the head and neck: an update // Am J Otolaryngol. – 2001. – 22(1). – P. 2–18.
6. Ries L.A.G., Kosary C.L., Hankey B.F. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999.
7. Rydholm A. Management of patients with soft-tissue tumors. Strategy developed at a regional oncology center // Acta Orthop Scand Suppl. – 1983. – 203. – P. 13–77.
8. Singer S., Demetri G.D., Baldini E.H., Fletcher C.D. Management of soft tissue sarcomas: an overview and update // Lancet Oncol. – 2000. – 1. – P. 75–85.
9. Stiller C.A., Stevens M.C.G., Magnani C. et al. Survival of children with soft tissue sarcoma in Europe since 1978: results from the EURO CARE study // Eur J Cancer. – 2001. – 37. – 767–74.

УДК 618.19-006.6-037:577.1702

А.Т. Амирасланов¹, Х.К. Мурадов², А.Г. Велиева¹**ВЛИЯНИЕ ЭНДОКРИННО-КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА НА ТЕЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ ГОРМОНПРОДУЦИРУЮЩЕГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**¹Азербайджанский Медицинский Университет, кафедра онкологии, Баку²Азербайджанский Медицинский Университет, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Баку**Контактная информация:**

Велиева Азигат Ганимат гызы, аспирант кафедры онкологии

адрес: AZ1073, Азербайджанская Республика, г. Баку, Ясамальский р-н, ул. Заида Халилова, 523-й квартал, д. 1, кв. 9; **тел.** +(99450)371-27-01;**e-mail:** ladymed77@hotmail.com

Статья поступила: 23.07.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Гормональный статус гормонпродуцирующего рака молочной железы по результатам наших исследований имеет выраженное клиническое, диагностическое и прогностическое значение. Учитывая значительное влияние эндокринного компонента на течение процесса, целесообразно рассматривать его как диагностический и прогностический критерий, определяющий, в свою очередь, соответствующую тактику лечения.

Ключевые слова: гормонпродуцирующий рак молочной железы, эндокринно-клеточный компонент, апудоциты.A.T. Amiraslanov¹, H.K. Muradov², H.Q. Veliyeva¹**THE INFLUENCE OF ENDOCRINE-CELL COMPONENT ON BEHAVIOR AND PROGNOSIS OF HORMONE PRODUCING BREAST CANCER**¹Azerbaijan Medical University, chief of department of oncology, Baku²Azerbaijan Medical University, department of histology, cytology and embryology, Baku**Abstract**

Morphological structure and hormonal status of hormone producing breast cancer have a big role in clinical behavior and prognosis of disease. That's why it's important to estimate the endocrine component as a diagnostic and prognostic criteria that determines the strategy of following treatment.

Key words: hormone producing breast cancer, endocrine-cell component, apud cells.**Введение**

Рак молочной железы и по сей день занимает ведущее место среди злокачественных опухолей у женщин и является наиболее частой причиной смертности от онкологических заболеваний у женского населения [3; 7]. Несмотря на широкий спектр проведенных исследований и большое количество опубликованных работ по этой теме, особенности некоторых вариантов РМЖ, их течение, лечение и прогноз требуют дальнейшего детального изучения [1; 2; 10]. Одной из наименее областей в онкологии, в том числе в онкологии молочной железы, являются опухоли, содержащие эндокринно-клеточный компонент или гормонпродуцирующие опухоли [5; 6; 8]. В настоящее время определяется роль нейроэндокринных медиаторов в этиопатогенезе, диагностике, лечении и прогнозе РМЖ [9; 10; 12]. С онкологической точки зрения наибольший интерес представляет секретиция таких веществ, как серотонин, мелотонин, гистамин, катехоламины, гастрин, адреналин и норадреналин, соматотропный гормон, инсулин, глюкагон, кальцитонин и др [1; 4; 7; 11; 12]. Эти опухоли и стали объектом исследования в нашей работе.

Цель исследования: изучение влияния гормонального статуса на течение и прогноз гормонпродуцирующего рака молочной железы (ГПРМЖ)

Материалы и методы

Нами был изучен архивный материал от 739 больных, в период 1995–2005 гг. получивших оперативное лечение по поводу РМЖ (проведено гистоло-

гическое, гистохимическое и электронно-микроскопическое исследование). Были применены следующие цитологические, гистологические, гистохимические и электронно-микроскопические методы исследования: гематоксилин-эозиновая реакция; гематоксилин-пикрофуксиновая реакция по методу Ван-Гизона; метиленовый синий-эозин; буферилированный 0,05%-ый тионин; уранаффиновая реакция, общее определение клеток с пара-эндокринными свойствами; аргирофильная реакция по методу Гримелиуса, определение пара-эндокринных клеток, секретирующих олигопептиды; аргентаффиновая реакция Masson-Hamperl; усовершенствованная паральдегид-фуксиновая реакция, определение синхронной секреции олигопептидов и аминов; комплексная аргенто-альдегид-фуксиновая реакция для определения глюкагона, гастрина и инсулина; полихромная гистохимическая реакция после фиксации в растворе бихромата, определение адреналина, норадреналина, гистамина и серотонина секретирующих клеток; электронная микроскопия ультратонких (450–470 нм) срезов параэндокринных клеток после контрастирования в растворах нитрата свинца и уранилацетата, парафинизации в эпохах, фиксации в глутар-альдегиде и 8-оксиде осмия.

Светооптическая микроскопия проводилась на микроскопах «Amplival» и «Nu-2E» («Karl Zeiss», Германия), электронная микроскопия – на микроскопе «JEM-100S» («JEOL», Япония). При измерении и подсчете использованы стандартные окулярные сетки, линейки, шкалы (ЛОМО, Санкт-Петербург), а также прозрачные целлоидиновые шкалы, накладывающиеся на электронно-микроскопические фотографии.

Для непараметрических показателей применены соответствующие методы корреляционной статистики, найдены коэффициент Пирсона (χ^2) на уровне достоверности ($R=0,95$).

Результаты и обсуждение

При исследовании материалов 128 больных ($17,32 \pm 1,4\%$) обнаружен эндокринно-клеточный компонент, что позволило отнести их в группу гормон-продуцирующего рака. В контрольную группу вошли 611 больных ($82,7 \pm 1,4\%$), опухоли которых не содержали секреторного компонента. Согласно превалирующему гормональному статусу опухолевой ткани нами были выявлены следующие гормонпродуцирующие варианты РМЖ:

- с преимущественной секрецией аминов (21 больная; $16,4 \pm 3,3\%$);
- с преимущественной секрецией олигопептидов (83 больные; $64,8 \pm 4,2\%$);
- со смешанной секрецией аминов и олигопептидов (24 больные; $18,8 \pm 3,4\%$).

У 6 ($28,6 \pm 9,9\%$) пациенток с аминопродуцирующим РМЖ заболевание выявлено в I стадии, у 14 ($66,7 \pm 10,3\%$) – во II клинической стадии и только у одной пациентки ($4,8 \pm 4,6\%$) – в III клинической стадии. Эти данные значительно отличались от аналогичных в контрольной группе ($\chi^2=11,9$; $p<0,01$).

В группе больных со смешанной секрецией гормонов в опухоли распределение по клиническим стадиям мало отличалось от таковых в контрольной группе: у 3 ($12,5 \pm 6,8\%$) больных процесс обнаружен в I стадии, у 15 ($62,5 \pm 9,9\%$) – во II клинической стадии, у 6 ($25,0 \pm 8,8\%$) – в III стадии ($\chi^2=14,9$; $p<0,05$). Среди больных с олигопептидпродуцирующим вариантом ГПРМЖ всего лишь у 1 ($1,2 \pm 1,2\%$) пациентки рак обнаружен в I стадии. 36 ($43,4 \pm 5,4\%$) из них обратились во II стадии и 46 ($55,4 \pm 5,5\%$) – в III стадии заболевания. Как видно из полученных результатов, основная доля пациенток приходится на II-III стадии, что достоверно отличается от данных, полученных в контрольной группе больных ($\chi^2=14,5$; $p<0,001$).

С помощью гистохимического и электронно-микроскопического исследования нами были выявлены патогномичные признаки отдельных вариантов ГПРМЖ. Решающими диагностическими критериями гормонпродуцирующих вариантов РМЖ являются уран-позитивность, избирательное окрашивание солями серебра, наличие нейроэндокринных секреторных гранул. Естественной необходимостью является определение гормонального статуса опухоли, т.е., выявление конкретных гормональных соединений, секретируемых опухолевыми клетками.

Среди ГПРМЖ в нашем исследовании были выявлены следующие гистологические типы: неинфильтративный рак – 21 случай ($16,4 \pm 3,3\%$); инфильтративный протоковый рак – 24 случая ($18,8 \pm 3,3\%$); инфильтративный дольковый рак – 36 случаев ($28,1 \pm 4,0\%$); инфильтративный протоково-дольковый рак – 47 случаев ($36,7 \pm 4,3\%$).

В ткани неинфильтративного рака молочной железы большинство составляют аргентаффиновые апудоциты, секретирующие биологические амины (рис. 1 и 2).

Инфильтративно-протоковый рак с эндокринно-клеточным компонентом содержит как аргентаффиновые, так и аргирофильные клетки. Гистохимическое исследование и электронная микроскопия выявили секрецию этими клетками биогенных ами-

нов наряду с выработкой олигопептидов. В гормон-продуцирующем дольковом и протоково-дольковом раке были обнаружены только аргирофильные апудоциты, секретирующие олигопептиды (рис. 3 и 4).

Анализируя цитологические, гистологические, гистохимические и электронно-микроскопические особенности эндокринно-клеточного РМЖ, мы выявили два принципиальных варианта специализации опухолевых клеток:

1. Моноспециализированные опухолевые апудоциты. Они обладают определенными гистохимическими и электронно-микроскопическими структурными и функциональными особенностями, отличными от других параметров специализации.
2. Мультиспециализированные (сочетанные) опухолевые апудоциты (апудоцитарно -неапудоцитарные специализированные клетки). Эти клетки выполняют как параэндокринную, так и железистую, слизисто-эндокринную и др. функции.

Эндокринно-клеточный опухолевый компонент чаще встречается при тех гистотипах РМЖ, для которых характерно наличие различных популяций опухолевых клеток. Поэтому мы считаем целесообразным применение специальных методов анализа с целью обнаружения секреторного компонента в опухолях с клетками разных типов.

Использованные нами гистохимические и электронно-микроскопические критерии деятельности выявили в ткани РМЖ паракринные, эндокринные, нейрокринные, амфикринные, аутокринные и, возможно, интракринные механизмы контроля гомеостаза. Данный контроль осуществляется посредством секреции следующих веществ:

1. Пептиды:
 - глюкагон,
 - гастрин,
 - инсулин
2. Амины:
 - серотонин,
 - гистамин,
 - адреналин,
 - норадреналин
3. Пептиды и амины:
 - синхронная секреция различных гормонов

Доказана зависимость метастатического потенциала опухоли от её гормонального статуса.

Аргирофильные апудоцитарные опухоли характеризуются наличием секреторных гранул пептидной ультраструктуры. Выявление аргентаффиновых клеток в опухолевой паренхиме указывает на преобладание секреторных гранул типа аминов.

Исследования показали, что аргирофильная субпопуляция, ввиду активизации процессов пролиферации, оказывает стимулирующее действие на течение злокачественного процесса, повышая его метастатическую агрессивность.

Опухоли с преобладанием аргентаффинового компонента обладают более низким потенциалом метастазирования и рецидивирования.

Обнаруженная корреляция может считаться новым фактором взаимосвязи гормонального статуса опухоли и её рецидивирования. В контрольной группе больных частота рецидивов составила $36,5 \pm 1,9\%$, метастазов $57,9 \pm 2,0\%$ случаев.

Так называемый «аминный профиль» РМЖ снижает рецидивирование ($9,5 \pm 6,4\%$; $\chi^2=5,32$; $p<0,05$) и метастазирование: ($23,8 \pm 9,3\%$; $\chi^2=9,64$; $p<0,01$).



Рис. 1. Гистохимическая картина аминопро-
дуцирующего РМЖ.

Окр.: Аргентаффинные опухолевые
клетки при реакции Masson-Hampel
Ув.: об. 10, ок. 10.

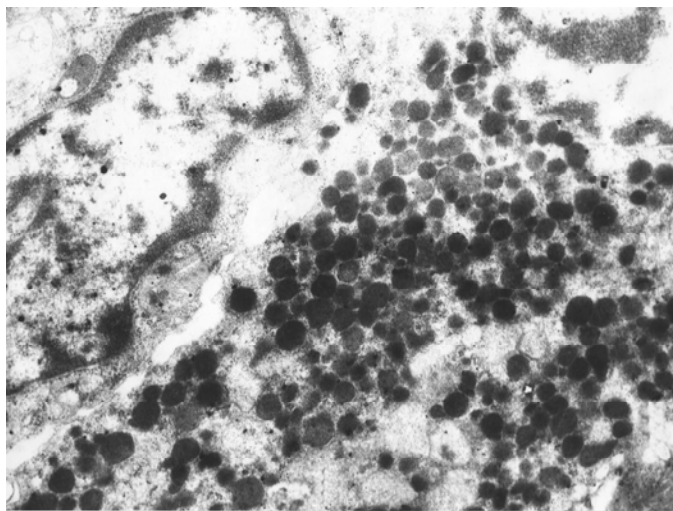


Рис 2. Электронная микроскопия аминопро-
дуцирующего РМЖ. В апудоцитах определяются секреторные гра-
нулы и митохондрии с отчетным матриксом.
Увеличение: $\times 20\,000$

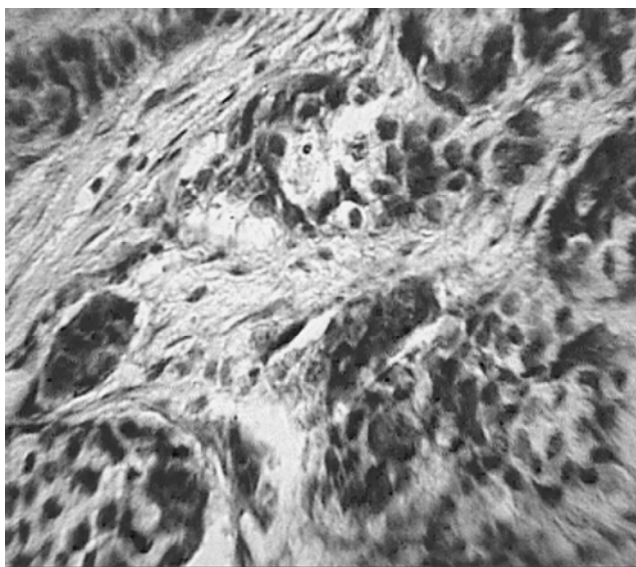


Рис. 3. Гистохимическая картина олигопептидпро-
дуцирующего РМЖ.

Окр: аргирофильная реакция по Гримелиусу
Увеличение: ок. 12,5; об. 40.

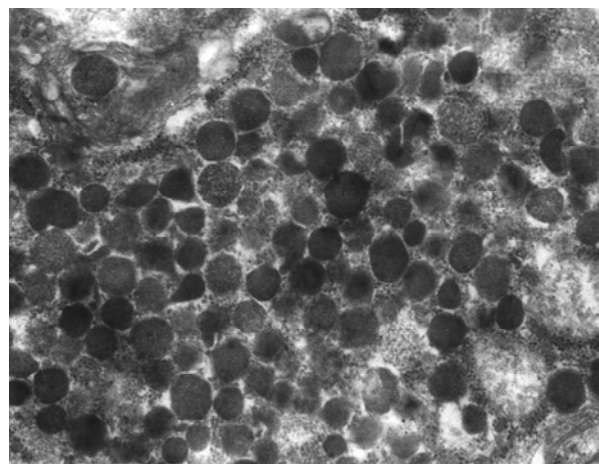


Рис. 4. Электронная микроскопия олигопептид-
продуцирующего РМЖ. Секреторные гранулы вы-
деляются в матриксе в виде зернистых и осмо-
фильных субстанций.
Увеличение: $\times 20\,000$

Наоборот, «олигопептидный профиль» опухоли активирует как метастазирование ($60,2 \pm 5,4\%$; $\chi^2=0,16$; $p>0,05$), так и рецидивирование ($42,2 \pm 5,4\%$; $\chi^2=1,01$; $p>0,05$) опухоли.

Показатели рецидивирования ($16,7 \pm 7,6\%$; $\chi^2=3,95$; $p<0,05$) и метастазирования ($33,3 \pm 9,6\%$; $\chi^2=5,70$; $p<0,05$) в группе опухолей со смешанной секрецией не сильно отличались от таковых в контрольной группе.

Проведена комплексная оценка результатов лечения ГПРМЖ. В нашем исследовании все эти больные получили лечение, аналогичное таковому в контрольной группе, с учетом стадии, гистотипа, морфологической градации и т.д.

Однако непосредственное влияние гормонального статуса опухоли на течение и прогноз заболевания позволяет сделать выводы о необходимости коррекции тактики лечения таких новообразований.

Так, при аминосекретирующем ГПРМЖ стандартные схемы терапии, основанные на основных клинко-морфологических показателях, полностью себя оправдывают.

В то же время ГПРМЖ с превалирующей секрецией олигопептидов требует применения всего арсенала комплексной терапии даже на ранней стадии процесса.

5-летняя выживаемость больных рассчитана по методу Каплан-Майер. Она отличалась в группах больных с ГПРМЖ различного гормонального статуса. Так, 5-летняя выживаемость больных РМЖ с превалирующей секрецией аминов составила $66,7 \pm 10,3\%$, в группе опухолей со смешанной секрецией – $58,3 \pm 10,1\%$ и, наконец, в группе опухолей с преимущественной секрецией олигопептидов – $53,0 \pm 5,5\%$. В контрольной группе этот показатель составил $51,3 \pm 2,0\%$.

Изучена также 5-летняя безрецидивная (без признаков заболевания) выживаемость больных в зависимости от гормонального статуса опухоли. Если в группе контроля она составила $40,1 \pm 2,0\%$, то в группе с аминопродуцирующим ГПРМЖ она составила $57,1 \pm 10,8\%$, при олигопептидной секреции – $41,0 \pm 5,4\%$, у больных с равноценной секрецией аминов и олигопептидов – $50,0 \pm 10,2\%$.

Заключение

Морфофункциональный статус гормонпродуцирующего РМЖ является важным диагностическим и прогностическим критерием заболевания, что доказывает целесообразность определения гормонального статуса данных опухолей для коррекции тактики лечения у улучшения прогностических показателей.

Литература

1. Adegbola T., Connolly C., Mortimer G. Small cell neuroendocrine carcinoma of the breast: a report of three cases and review of the literature. J Clin Pathol 58:775-778, 2005.
2. Ajisaka H., Maeda K., Miwa A. et al. Breast cancer with endocrine differentiation: report of two cases showing different histologic patterns. Surg Today 33:909-912, 2003.
3. Ando H., Maeda S., Kameoka N. et al. A case of primary carcinoid tumor of the breast. J Jpn Surg Assoc 2006; 67:763-7 (in Japanese with English abstract).
4. Bergman S., Hoda S., Geisinger K. et al. E-cadherin-negative primary small cell carcinoma of the breast. Report of a case and review of the literature. Am J Clin Pathol 121:117-121, 2004.
5. Bigotti G., Coli A., Butti A. et al. Primary small cell neuroendocrine carcinoma of the breast. J Exp Clin Cancer Res 23:691-696, 2004.
6. Fujimoto Y., Yagyu R., Murase K. et al. A case of solid neuroendocrine carcinoma of the breast in a 40-year-old woman. Breast Cancer 2007; 14:250-3.
7. Joshems L., Tjalma W. Primary small cell neuroendocrine tumour of the breast. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 115:231-233, 2004.
8. Kim J., Lee S., Park J. et al. Extrapulmonary small-cell carcinoma: a single-institution experience. Jpn J Clin Oncol 34:250-254, 2004.
9. Mariscal A., Balliu E., Diaz R. et al. Primary oat cell carcinoma of the breast: imaging features. AJR Am J Roentgenol 183: 1169-1171, 2004.
10. Robertson R., Geiger W., Davis N. Carcinoid tumors. Am Fam Physician 2006; 74:429-34
11. Sridhar P., Matey P., Aluwihare N. Primary carcinoma of breast with small-cell differentiation. Breast 13:149-151, 2004.
12. Upalakalin J., Collins L., Tawa N. et al. Carcinoid tumors in the breast. Am J Surg 2006; 191:799-805.

УДК 616-097:616-006-085.371:611.018.83

*И.Н. Михайлова, К.Д. Никитин, Н.Н. Петенко, К.А. Парсункова, И.А. Утяшев, М.А. Рубцова,**Г.З. Чкадуа, К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников***МЕТОД ELISPOT ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУННОГО ОТВЕТА
НА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВАКЦИНЫ
НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК,
НАГРУЖЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫМ ЛИЗАТОМ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Михайлова Ирина Николаевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела биотерапии опухолей НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-90-34;**e-mail:** irmikhaylova@gmail.com

Статья поступила: 01.09.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Иммуноterapia – перспективный метод лечения злокачественных новообразований. Для оценки эффективности иммунотерапевтических препаратов требуются точные методы оценки иммунного ответа. Мы провели исследование иммунного ответа на терапию противоопухолевыми вакцинами на основе аутологичных дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом, с целью оценить применимость метода ELISpot в условиях клинического исследования. В открытое одноцентровое клиническое исследование I фазы для оценки безопасности и эффективности терапевтической противоопухолевой вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток *in vitro*, были включены 15 больных диссеминированной меланомой кожи. Иммунный ответ выявлен у трети (5) больных, получавших вакцинацию, развитие иммунного ответа не коррелировало с клиническими изменениями. Отмечена связь между иммунным ответом и реакцией гиперчувствительности замедленного типа и увеличение частоты иммунного ответа у больных с низким уровнем опухолевого маркера S-100 (т.е. с наименьшей опухолевой нагрузкой).

Ключевые слова: иммунный ответ, противоопухолевая вакцина, аутологичные дендритные клетки.*I.N. Mikhailova, K.D. Nikitin, N.N. Petenko, K.A. Parsunkova, I.A. Utyashev, M.A. Rubtsova,**G.Z. Chkadua, K.A. Baryshnikov, L.V. Demidov, A.Yu. Baryshnikov***IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS TREATED
WITH DENDRITIC CELLS-BASED
ANTICANCER VACCINE ESTIMATED BY ELISPOT***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Immunotherapy of tumor is considered to be a promising approach for cancer treatment. The precise methods of immune response efficacy assessment are not fully characterized. We have conducted phase I single center open study to assess applicability of ELISpot method for immune response assessment in 15 melanoma patients treated with dendritic cells-based anticancer vaccine. Immune response was detected in 33 % (5) of patients. Here we show that the activation of immune response did not correlate to clinical response but to delayed hypersensitivity reaction development. Our observations indicate that ELISpot-detected immune response was more common in patients who had initially low S-100 marker level.

Key words: immune response, anticancer vaccine, dendritic cells.**Введение**

Иммуноterapia – перспективный метод лечения злокачественных новообразований. Клиническое исследование методов иммунотерапии затрудняется недостаточной чувствительностью традиционных методов оценки ответа на лечения, используемых в исследованиях противоопухолевых препаратов.

Метод ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot – твердофазная модификация метода иммуноферментного анализа). Изначально ELISpot был разработан Czerkinsky и соавт. в 1983 г. [4] для подсчета В-лимфоцитов, продуцирующих специфические антитела, а затем был адаптирован для разных задач, в особенности для идентификации и подсчета цитокин-продуцирующих клеток с точностью вплоть до отдельных клеток. ELISpot позволяет визуализировать вещество, продуцируемое отдельными активированными

клетками, и предоставляет как качественную (тип продуцируемого вещества), так и количественную (число активированных клеток) информацию.

Метод ELISpot широко применяется в разработке противовирусных вакцин, но также нашел применение и в онкоиммунологии.

Для оценки применимости метода ELISpot в клинических исследованиях мы провели исследование иммунного ответа на терапию противоопухолевыми вакцинами на основе аутологичных дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом.

Материалы и методы

Больные получали противоопухолевую вакцину на основе ДК в адьювантном и терапевтическом режиме внутривенно в начальной (стартовой) дозе $1-5 \times 10^6$ ДК.

Интервалы между введениями составляли 2 недели. Вакцинация продолжалась вплоть до развития прогрессирования (рис. 1). Оценка иммунного ответа на вакцинацию осуществлялась с помощью определения числа лейкоцитов периферической крови, активирующихся в ответ на стимуляцию лизатом аллогенных опухолевых клеток линии mel Kor, методом ELISpot. Для этого у больных перед 1-й, 3-й, 5-й и 10-й вакцинациями производился забор образцов периферической крови (4–10 мл) – точки 0; 1; 2 и 3 (рис. 2). Образцы крови набирались в пробирку Vacutainer (Becton Dickinson, США) с антикоагулянтом и отправлялись в лабораторию, где в течение суток из них выделялись и замораживались лейкоциты. После завершения вакцинотерапии образцы лейкоцитов, размораживались, и оценивалось число лейкоцитов, активирующихся в ответ на стимуляцию лизатом аллогенных опухолевых клеток линии mel Kor. Активация оценивалась по продукции ИФН- γ лейкоцитами с помощью метода ELISpot. Для стимуляции лимфоцитов в реакции ELISpot использовался лизат опухолевых клеток меланомы линии mel Kor. В качестве отрицательного контроля оценивалась фоновая секреция ИФН- γ не стимулированными лейкоцитами. Положительным контролем служили лейкоциты, активированные неспецифическим стимулятором фитогемагглютинином (ФГА). Использовалась методика, описанная в литературных источниках, с незначительными модификациями. Учет результатов реакции проводили с помощью прибора AID EliSpot Reader System Standard Resolution (AID Diagnostika GmbH, Германия) и программного обеспечения Aid EliSpot software Version 5.0. Для повышения точности исследования и исключения воздействия случайных факторов анализ каждой пробы (не стимулированные лимфоциты, лимфоциты + лизат и лимфоциты + ФГА) в каждой точке (0; 1; 2 или 3) повторялся по возможности 6 раз, но не менее 3 раз; в зависимости от доступного количества лимфоцитов, максимальное число повторов доходило у некоторых больных до 12. Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы SPSS Statistics v.17.0.

Результаты

Всего в данный анализ включено 15 больных – 8 (53 %) мужчин и 7 (47 %) женщин. Средний возраст 53 года (23–89; медиана 53).

Для исключения неспецифической (фоновой) активации, не связанной со стимуляцией клеток лизатом, была рассчитана разница (D) между средним числом клеток на 100 000 лейкоцитов, активирующихся в ответ на стимуляцию лизатом ($N_{\text{лиз}}$), и числом клеток, продуцирующих ИФН- γ в отсутствие стимуляции ($N_{\text{н/ст}}$):

$$D = N_{\text{лиз}} - N_{\text{н/ст}}$$

Критерием наличия иммунного ответа на вакцинацию мы приняли увеличение разницы (D) между средним числом клеток на 100 000 лейкоцитов, активирующихся в ответ на стимуляцию лизатом ($N_{\text{лиз}}$), и числом клеток, продуцирующих ИФН- γ в отсутствие стимуляции ($N_{\text{н/ст}}$), в процессе вакцинации. Число больных с иммунным ответом (у которых D хотя бы в одной из точек в процессе вакцинации [D_1 ; D_2 или D_3] оказалось больше, чем D до вакцинации [D_0]), составило 5 из 15 (33%). При этом у 1 больного максимальное (в 3-й точке) число ИФН- γ -продуцирующих клеток оказалось в 8

раз больше, чем до вакцинации, у 1 больной – в 5 раз (во 2-й точке), у 1 больного – в 6 раз (в 1-й точке). У больных с иммунным ответом, выявленным в соответствии с предложенным критерием, на протяжении вакцинации отмечено нарастающее повышение числа лейкоцитов, активирующихся на стимуляцию лизатом (рис. 3).

У части больных наблюдалось развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), проявлявшейся преимущественно изменениями в месте введения вакцины – покраснение, отек, зуд, жжение. В частности, ГЗТ наблюдалось у 6 (40 %) из 15 больных, у которых был оценен иммунный ответ по данным реакции ELISpot. Реакция ГЗТ наблюдалась достоверно чаще у больных с иммунным ответом ($p=0,02$; точный односторонний критерий Фишера). Отмечено выраженное увеличение числа клеток, продуцирующих ИФН- γ в ответ на стимуляцию опухолевым лизатом, у больных с ГЗТ на протяжении всей вакцинации, в то время как у больных без ГЗТ на фоне вакцинаций увеличения этого показателя не происходило. Число ИФН- γ -продуцирующих клеток у больных с реакцией ГЗТ в точке 1 по сравнению с точкой 0 увеличилось в 6 раз, в точке 2 — более чем в 9 раз, в точке 3 – почти в 74 раза.

Прогрессирование заболевания у больных, которым была проведена оценка иммунного ответа, наступило у 10 из 15 человек. Среднее время до прогрессирования среди больных, у которых был выявлен иммунный ответ, составило $9,6 \pm 6,2$ мес ($3 \div 26$ мес.; медиана 11 мес.; $n = 5$), у больных без иммунного ответа – $6,7 \pm 3$ мес ($1 \div 11$ мес.; медиана 7 мес.; $n = 10$; рис. 4).

У 15 больных, которым удалось оценить иммунный ответ, был исследован уровень опухолевого маркера S-100. Известно, что данный маркер свидетельствует о прогрессировании заболевания и, в целом, об опухолевой нагрузке у больных меланомой [5–7; 9]. Уровень маркера исследовался 2 раза – до вакцинации и во время нее (3 точка во время вакцинации). В нашем исследовании средний уровень S-100 у больных до начала вакцинации ($n = 15$) составил $75,5 \pm 53,7$ нг/л ($0,1 \div 208,9$ нг/л; медиана 69,1 нг/л), в процессе вакцинации – $131,4 \pm 83,2$ нг/л ($4,1 \div 308,1$ нг/л; медиана 95,7 нг/л) при норме 54 нг/л. Таким образом, отмечена тенденция к увеличению уровня S-100, что согласуется с общей характеристикой группы (больные поздними стадиями меланомы) и клиническими данными (прогрессирование заболевания у 2/3 больных на протяжении периода наблюдения). Можно отметить, что у больных с выявленным иммунным ответом уровень S-100 изначально и в процессе вакцинации был ниже, то есть можно предположить, что вакцинотерапия более эффективна у больных с исходно низкой активностью заболевания. У больных без иммунного ответа произошло статистически значимое увеличение уровня S-100 (рис. 5).

Обсуждение

Наше исследование было посвящено возможностям метода ELISpot для оценки иммунного ответа на вакцинацию противоопухолевой вакциной на основе аутологических ДК, нагруженных опухолевым лизатом. Метод ELISpot – удобный и надежный способ оценки иммунного ответа. Метод отличается высокой точностью (1 клетка на 100 000 и менее), что позволяет оценивать изменения в уровне отдельных клеток.

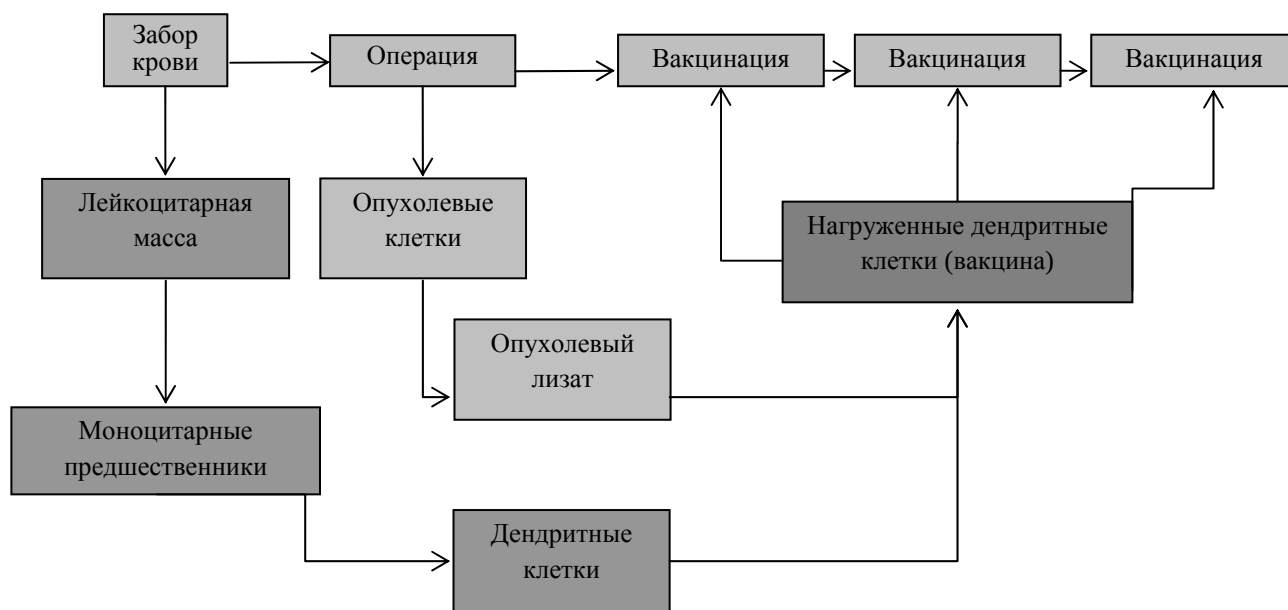


Рис. 1. Схема клинического исследования I фазы для оценки безопасности и эффективности терапевтической противоопухолевой вакцины на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), нагруженных лизатом опухолевых клеток *in vitro*, для адъювантной терапии диссеминированной меланомы кожи IV ст.

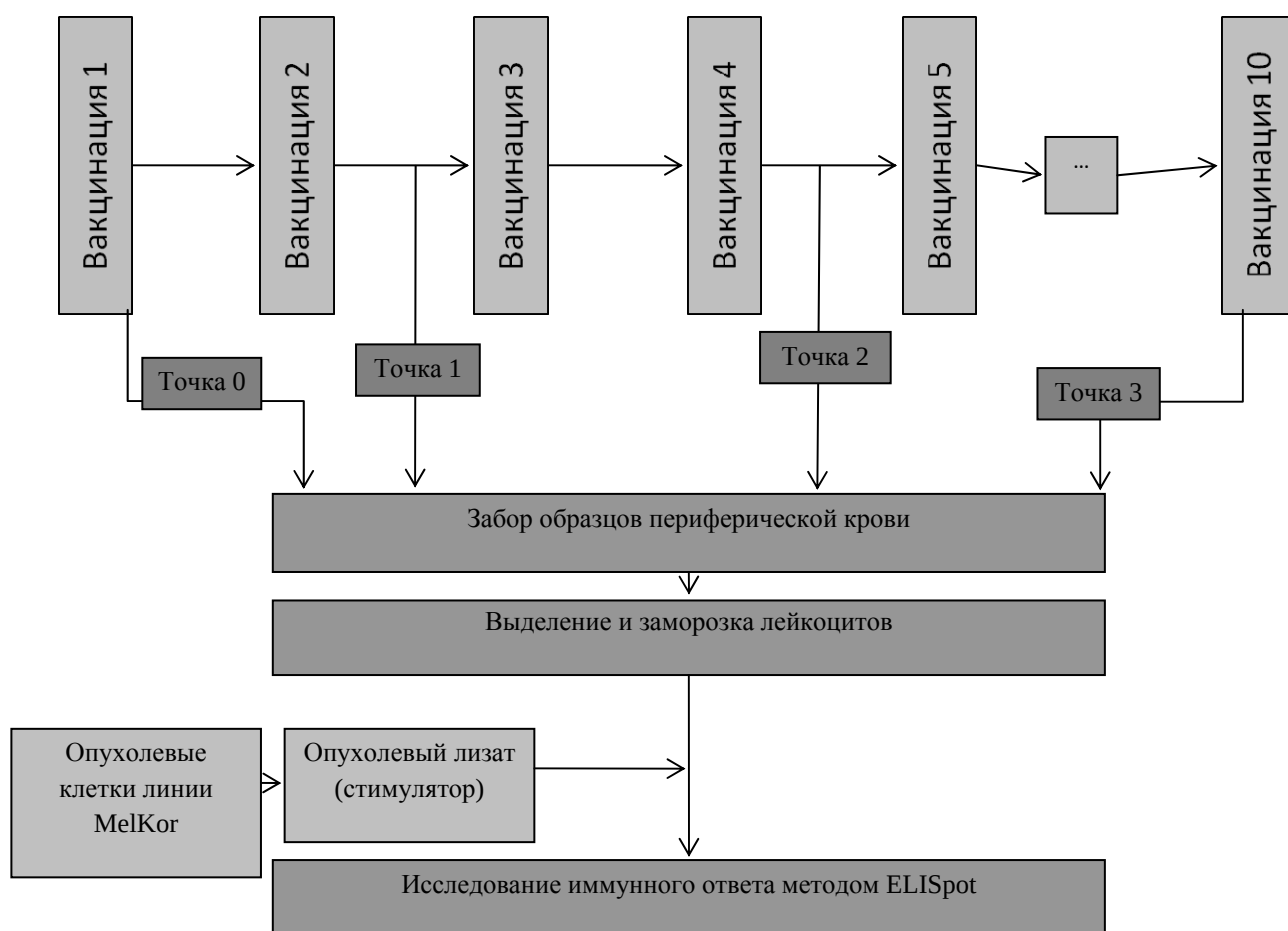
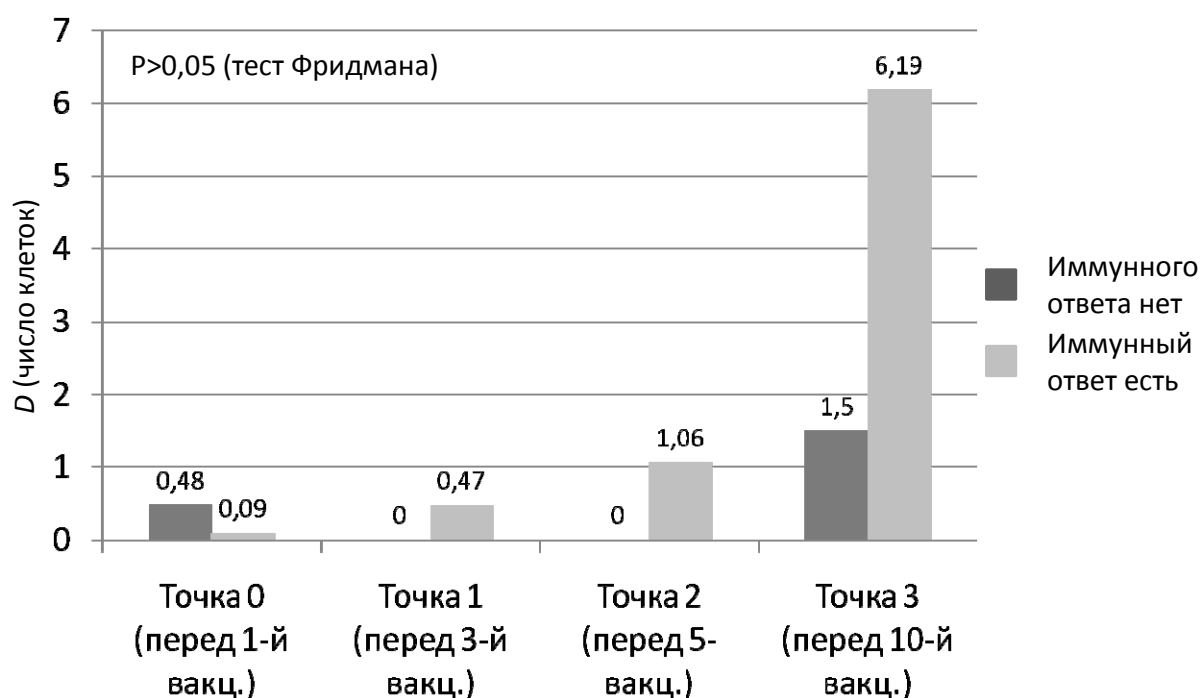


Рис. 2. Схема исследования иммунного ответа у больных меланомой кожи IV ст., получающих иммунотерапию вакциной на основе дендритных клеток.



$$D = N_{\text{лиз}} - N_{\text{н/ст}}, \text{ где}$$

- $N_{\text{лиз}}$ – среднее число ИФН- γ -продуцирующих клеток на 100 000 лейкоцитов (*опыт*)
- $N_{\text{н/ст}}$ – среднее число ИФН- γ -продуцирующих клеток на 100 000 лейкоцитов (*фоновая секреция*)

Рис. 3. Изменение числа лейкоцитов, активирующихся в ответ на стимуляцию опухолевым лизатом, у больных меланомой кожи, в процессе иммунотерапии вакциной на основе аутологичных дендритных клеток.

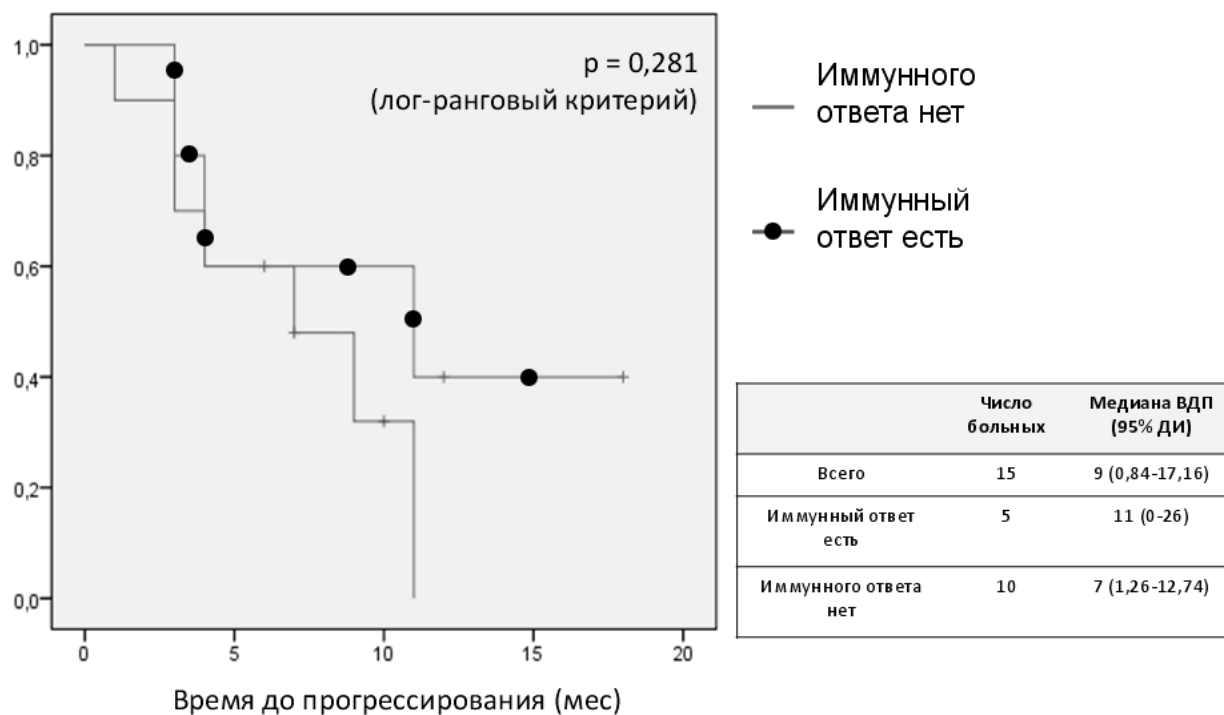


Рис. 4. Время до прогрессирования у больных меланомой кожи, получавших иммунотерапию вакциной на основе аутологичных дендритных клеток.

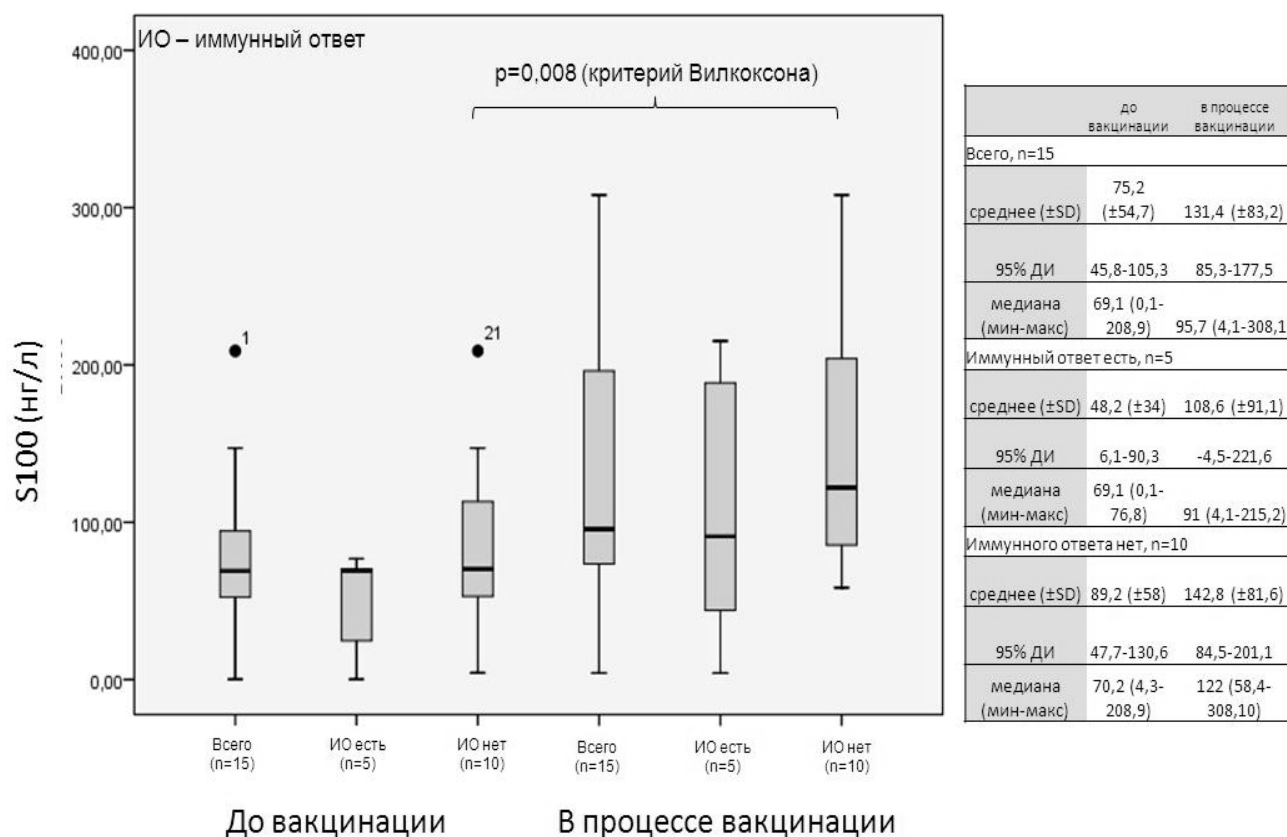


Рис. 5. Изменение уровня S-100 у больных меланомой кожи, получавших иммунотерапию вакциной на основе аутологических дендритных клеток.

Применение метода ELISpot дало ряд результатов, ценных для изучения дендритноклеточных противоопухолевых вакцин.

Согласно литературным данным, иммунный ответ методом ELISpot выявляется у 30–70% больных, получающих иммунотерапию противоопухолевыми вакцинами на основе ДК [3; 8]. Такой значительный разброс связан с небольшим числом больных в большинстве исследований и различными, зачастую принципиально отличными вариантами противоопухолевых вакцин, оценивавшихся в исследованиях.

Результаты нашего исследования иммунного ответа у больных, получающих иммунотерапию, в общем и в целом сопоставимы с результатами других сходных исследований: увеличение числа клеток, активирующихся в ответ на стимуляцию опухолевыми антигенами в процессе иммунизации вакцинами на основе аутологических ДК, наблюдалось у трети больных поздними стадиями меланомы (у 5 из 15 больных).

Корреляции между клинической эффективностью вакцины и иммунологическими реакциями выявлено не было, что, впрочем, неудивительно с учетом поздней стадии заболевания у включенных больных. Отсутствие связи между иммунологической эффективностью вакциноотерапии и клиническими изменениями отмечают и некоторые зарубежные исследователи [3]. Можно отметить, что у больных с выявленным иммунным ответом уровень маркера S100 изначально и в процессе вакцинации был ниже, то есть можно предположить, что вакциноотерапия более эффективна у больных с исходно низкой активностью заболевания.

Важным представляется вопрос выбора антигена для стимуляции иммунных клеток в реакции ELISpot. В нашем исследовании в качестве источника антигенов был выбран лизат опухолевых клеток линии mel Kog.

Линия mel Kog получена в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и отличается быстрым ростом, подвергается трансфекции различными генами [1]. Клетки линии mel Kog выбраны в качестве стимулятора в связи с тем, что они экспрессируют большее число меланомных опухолеассоциированных антигенов; таким образом, вероятность развития «перекрестной» реакции между Т-лимфоцитами больных, специфичных к ОАА опухоли больного, и ОАА, имеющимися в лизате клеток линии mel Kog, представляется наибольшей.

Отличительной особенностью клеток mel Kog является отсутствие на их поверхности молекул МНС I и II классов. Преимущество подобного подхода в том, что ДК, нагруженные цельным белком, могут быть более эффективны для индукции антиген-специфического иммунного ответа.

Этот иммунный ответ при этом может быть направлен против широкого спектра антигенов, независимо от HLA.

Исследования других авторов подтверждают развитие клинического ответа при использовании цельноклеточного лизата [8] и недостаточную эффективность применения HLA-рестрицированных пептидов, возможно, в связи с нехваткой активации CD4+ Т-лимфоцитов [2]. В будущих исследованиях представляет интерес использование для стимуляции иммунных клеток в реакции ELISpot отдельных антигенных пептидов.

Заключение

Метод ELISpot – удобный способ оценки иммунного ответа у онкологических больных, получающих иммунотерапевтические препараты.

Даже у больных поздними стадиями злокачественных новообразований он позволяет выявить изменения в числе иммунореактивных клеток.

Результаты исследования согласуются с другими иммунологическими показателями, отражающими общую иммунореактивность организма и опухолевую нагрузку, но, в отличие от них, дают представление о развитии опухолеспецифических реакций.

Отличительной особенностью метода является его относительная простота и субъективность, позволяющая получать воспроизводимые результаты, и удобство применения в рамках клинических исследований, когда количество исследуемого материала ограничено. Значительной проблемой остается отсутствие единых стандартов проведения исследований с помощью метода ELISpot, не позволяющее сравнивать между собой результаты разных авторов. В клинических исследованиях противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток метод ELISpot оказывается незаменимым инструментом оценки даже самых минимальных изменений в числе и функциональной активности опухолеспецифических иммунных клеток.

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

Литература

1. Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Барышников А.Ю. и др. Клинические испытания аутологичной вакцины на основе опухолевых клеток, модифицированных геном tag-7 // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 23–7.
2. Butterfield L.H., Ribas A., Disette V.B. et al. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides // Clin Cancer Res. – 2006. – 12. – P. 2817–25.
3. Butterfield L.H., Comin-Anduix B., Vujanovic L. et al. Adenovirus MART-1-engineered autologous dendritic cell vaccine for metastatic melanoma // J Immunother. – 2008. – 31(3). – P. 294–309.
4. Czerkinsky C., Nilsson L., Nygren H. et al. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells // J Immunol Methods. – 1983. – 65(1–2). – P. 109–21.
5. Guo H.B., Stoffel-Wagner B., Bierwirth T. et al. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma // Eur J Cancer. – 1995. – 31A. – P. 924–8.
6. Hauschild A. Predictive value of serum S100B for monitoring patients with metastatic melanoma during chemotherapy and/or immunotherapy // Br J Dermatol. – 1999. – 140. – P. 1065–71.
7. Kruijff S., Bastiaannet E., Kobold A.C. et al. S-100B concentrations predict disease-free survival in stage III melanoma patients // Ann Surg Oncol. – 2009. – 16(12). – P. 3455–62.
8. Palmer D.H., Midgley R.S., Mirza N. et al. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma // Hepatology. – 2009. – 49(1). – P. 124–32.
9. Smit L.H., Korse C.M., Hart A.A. et al. Normal values of serum S-100B predict prolonged survival for stage IV melanoma patients // Eur J Cancer. – 2005. – 41. – P. 386–92.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



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

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

**РАЗЛИЧИЯ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ Ph^+ КЛЕТОК ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ХМЛ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ:
3. Ph^+ КЛЕТКИ С ЧЕРЕДОВАНИЕМ ЭТАПОВ ЭФФЕКТИВНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЭФФЕКТИВНОГО СОЗРЕВАНИЯ**

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Контактная информация:

*Гринева Нина Ивановна, д-р хим. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории генной инженерии
адрес: 125167, Москва, Новозыковский проезд, д. 4а; тел. +7(499)615-31-02;
e-mail: nigrin27@mail.ru*

Статья поступила: 19.06.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

При исследовании пролиферации и дифференцировки Ph^+ клеток 3 типа от разных больных ХМЛ в суспензионной культуре обнаружена и изучена клеточная регуляция ПД этих клеток, которая осуществляется при чередовании этапов эффективной пролиферации и эффективного созревания с ингибированием пролиферации накапливающимися нейтрофилами при блокировании апоптоза. Чередование этапов состоит в замене этапа 1 – этапа эффективной пролиферации, протекающего с большей скоростью пролиферации Ph^+ клеток, чем скорость созревания нейтрофилов, на этап 2 – этап эффективного созревания, на котором скорость созревания нейтрофилов больше скорости пролиферации Ph^+ клеток. Неоднократное чередование этапов следует схемам: 1/2–1/2/1 или 2/1–2/1/2/1. При этом соотношение скоростей пролиферации и созревания – индекс эффективности P/D – на этапе пролиферации $P/D \geq 1$, а на этапе созревания $P/D \leq 1$. Кинетические кривые этапов чередования, пересекаясь проходят контрольные точки, в которых показатели этапов пролиферации и созревания одинаковы. В течение этапов чередований эти показатели, напротив, постоянно изменяются. Индексы эффективности P/D в контрольных точках равны $1,06 \pm 0,23$, они не зависят от времени и порядка чередования, а также от концентрации клеток и от источника Ph^+ клеток – от больных ХМЛ. На этапах пролиферации повышено содержание пролиферирующих незрелых и миелоцитов, понижено содержание созревающих нейтрофилов и индуцирован апоптоз. На этапах созревания, наоборот, блокирован апоптоз, повышено содержание нейтрофилов, особенно сегментоядерных, но понижено содержание незрелых. На этапе созревания нейтрофилы в повышенной концентрации ингибируют пролиферацию незрелых Ph^+ клеток и миелоцитов, претерпевают инверсию порядка созревания нейтрофилов с нарушением их созревания, вероятно, по механизму обратной связи. Чередования этапов пролиферации и созревания регулируют эффективность и поддерживают пролиферацию и дифференцировку Ph^+ клеток в оптимальном режиме. Ph^+ клетки 3 типа обнаружены у ~ половины исследованных больных ХМЛ, все в ХФ ХМЛ.

Ключевые слова: ХМЛ, культивирование Ph^+ клеток *in vitro*, кинетика пролиферации и дифференцировки, апоптоз, чередование этапов пролиферации и дифференцировки, эффективность пролиферации и дифференцировки.

N.I. Grineva, T.V. Akhynina, L.P. Gerasimova, T.E. Manakova, D.A. Schmarov, N.G. Sarycheva, T.V. Borovkova, N.M. Nydenova, G.P. Sarkisyan, A.M. Tumofeev, L.Yu. Kolosova, T.I. Kolosheynova, L.G. Kovaleva, S.V. Kusnetsov, O.Yu. Vinogradova, E.Yu. Chelysheva, A.G. Turkina

**THE PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF Ph^+ CELLS FROM INDIVIDUAL CML PATIENTS GROW IN SUSPENSION:
3. THE INTERCHANGE BETWEEN PROLIFERATION AND MATURATION IN Ph^+ CELLS**

GU Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Abstract

The characteristic features of the transition from chronic phase to blast crisis include proliferation, differentiation and resistance to apoptotic cell death. When grown in suspension Type 3 Ph^+ cells from different patients, PD regulation occurs through the interchange between effective proliferation and effective maturation with the inhibition of accumulating neutrophils as the results of apoptosis blockade. This becomes realizable because of substitution of effective proliferation, Step 1, for the effective maturation, Step 2. The characteristic feature of Step 1 is the high rate of Ph^+ cells proliferation against the background of neutrophils maturation, while the characteristic hallmark of Step 2 is the effective maturation rate of neutrophils. The reiterated interchange these steps follows 1/2–1/2/1 or 2/1–2/1/2/1. The ratio of proliferative rate to maturation rate, so-called P/D is always higher than 1 on Step 1 and lower than 1 on Step 2. The kinetic curves of these steps crossed in control dot with the equal rate of proliferation and maturation. The efficacy index, P/D, in controls comes to 1.06 ± 0.23 and does not depend on time, density of cells and the source of Ph^+ cells. When Ph^+ cells proliferate, the density of non-maturated cells and myelocytes is increased, the density of maturing neutrophils is reduced, and the apoptosis is massive. On the other hand, when the Ph^+ cells mature, the neutrophils' high density inhibits proliferation of non-maturated Ph^+ cells and myelocytes and introduces some disturbances in maturation step. We conclude that the most reasonable mechanism is the feedback mechanism. Type 3 Ph^+ cells were identified in half of patients with CML, all of them were patients with chronic phase of disease.

Key words: CLM, Ph^+ cells growth *in vitro*, the proliferative and differentiation kinetic, interchange between proliferation and differentiation.

Введение

Несмотря на многочисленные исследования кроветворных клеток, содержащих Ph-хромосому и участвующих в патологии ХМЛ, в культурах и *in vivo* [1; 8; 13; 19; 20; 29; 31; 36], а также в более поздних и обстоятельных работах [10; 11; 15–17; 21–28; 30; 32; 33; 34; 37] отсутствует единая концепция биологических и молекулярных аспектов этих процессов и их связи между собой. Это в полной мере касается ПД Ph⁺клеток *ex vivo* и *in vivo*.

Ранее были выявлены 3 типа Ph⁺клеток от индивидуальных больных ХМЛ, которые различались разной эффективностью ПД и скоростью накопления пролиферирующих и созревающих без деления Ph⁺клеток. При 1 типе ПД с большей эффективностью протекает пролиферация миелоидных клеток, Р, при очень низком накоплении неделящихся нейтрофилов, клеток D. При 2 типе ПД с большей скоростью накапливаются клетки D; их дифференцировка происходит с низкой эффективностью и с ингибированием пролиферации незрелых клеток Р нейтрофилами, созревающими без деления. Пролiferация и дифференцировка 3 типа Ph⁺клеток за то же время протекает с неоднократным чередованием этапов пролиферации и созревания с частотой чередования от 0,5 до 6 сут [3; 8].

Целью данной работы являлось изучение ПД Ph⁺клеток 3 типа от различных больных ХМЛ в суспензионной культуре и выяснение роли чередования эффективной пролиферации с эффективным созреванием в регуляции ПД Ph⁺клеток.

Материалы и методы

Материалы и методы детально приведены в Сообщении 1 и др. [8; 3]. Характеристика исходных Ph⁺моноклеаров и больных ХМЛ, из ПК и КМ которых выделены клетки, дана в сообщении 1 [8]. Параметры ПД Ph⁺клеток 3 типа приведены в табл. 1–2.

Результаты и обсуждение

Для характеристики ПД Ph⁺клеток 3 типа от различных больных ХМЛ получали кинетические кривые ПД моноклеаров в одинаковых условиях суспензионной культуры, и результаты анализировали, как описано в [3; 8]. Популяция моноклеаров при ХМЛ состоит из лейкоцитов (~90 %), содержащих 70–90 % миелоидных клеток, в основном гранулоцитов [1; 2; 6; 7]. Поэтому исследовали рост популяции лейкоцитов, их гибель, апоптоз гранулоцитов, ПД субпопуляций лейкоцитов и гранулоцитов, распределение гранулоцитов по фазам клеточного цикла. Также исследовали скорости пролиферации клеток Р (**бласты + промиелоциты + миелоциты**) и созревания нейтрофилов D (**ММ + ПЯ + СЯ**). По соотношению скоростей накопления клеток Р и клеток D определяли кинетические изменения индексов эффективности P/D.

Согласно [8] Ph⁺клетки 3 типа пролиферируют и дифференцируются с неоднократным чередованием этапов, поочередно протекающих то с большей скоростью пролиферации, то с большей скоростью созревания. Другими словами этап с «преимуществом скорости пролиферации» – эффективная пролиферация чередуется с эффективным созреванием – этапом с «преимуществом скорости созревания» или сокращенно – этап пролиферации чередуется с этапом созревания. При этом в каждом из этапов происходят оба процесса – и

пролиферация и созревание с разным соотношением их скоростей, следовательно, с разной эффективностью. При преимуществе пролиферации индекс эффективности $P/D \geq 1$, при преимуществе созревания индекс $P/D \leq 1$.

Результаты исследования ПД Ph⁺клеток 3 типа в культуре представлены в табл. 1 и 2 и на рис. 1–8. Чередование этапов пролиферации и созревания видно по пересечению кинетических кривых накопления незрелых клеток, Р ([нз]), и созревающих клеток D ([з]), которые приведены на рисунках (б) одновременно с кинетикой индексов эффективности P/D, выражаемых отношением скоростей накопления клеток Р и D. При ПД встречаются одно–четырёхкратные чередования этапов по схемам 1/2–1/2/1 или 2/1–2/1/2/1 с частотой от 1 до 6 сут, изредка 0,2–8 сут (табл. 2), где 1 – этап пролиферации, 2 – этап созревания.

Индексы эффективности P/D

На рис. 1–8 и в табл. 1 и 2 видно, что чередование этапа пролиферации протекает с индексом эффективности $P/D^1 > 1$, а этапа созревания с $P/D^2 < 1$. При чередовании этапов по схеме 1/2–1/2/1 скорости и, следовательно, концентрации клеток изменяются в ряду $[нз] > [з] \rightarrow [з] > [нз] \rightarrow [нз] > [з]$ (рис. 1–5 в, е). При чередовании этапов по схеме 2/1–2/1/2/1 скорости и концентрации изменяются в ряду: $[з] > [нз] \rightarrow [нз] > [з] \rightarrow [з] > [нз]$ (рис. 6–8 в). В табл. 1 даны показатели чередования в течение этапов пролиферации и созревания при ПД образцов Ph⁺клеток 3 типа, в табл. 2 характеристики в точках пересечения кинетических кривых этапов пролиферации и созревания – в «равновесных точках чередования».

В момент пересечения кривых накопления пролиферирующих клеток Р (скорость пролиферации) и созревающих без деления нейтрофилов D (скорость созревания) происходит смена этапов чередования, скоростей накопления Ph⁺клеток и других показателей ПД. В точках пересечения кривых клеток Р и клеток D скорости накопления клеток Р и D и индексы эффективности P/D^1 и P/D^2 одинаковы (в среднем $1,06 \pm 0,23$, табл. 2).

Они не зависят от схемы, времени и последовательности чередования, а также от концентрации клеток и от их источника – от больного ХМЛ. Точки пересечения можно назвать равновесными или критическими. Другие характеристики пересечения на этапах пролиферации и созревания – концентрации незрелых клеток и зрелых/созревающих нейтрофилов ($0,4\text{--}0,7 \times 10^6/\text{мл}$) и СЯ ($0,1\text{--}0,4 \times 10^6/\text{мл}$) также имеют довольно близкие значения. Однако наблюдаются и заметные колебания – $1,53\text{--}0,1 \times 10^6/\text{мл}$ для КМ 3.5, ПК 3.10, 3.11 и КМ 3.12 (табл. 2). Возможно, эти показатели зависят от концентрации Ph⁺клеток

В течение этапов чередования показатели наоборот постоянно меняются, проходят повышение и понижение, минимумы и максимумы, которые, как правило, асинхронны друг другу (рис. 1–8, а–е, табл. 1).

Индексы P/D зависят от этапа чередования. Они растут или уменьшаются в своих пределах: индекс $P/D^1 > 1$, $P/D^2 \leq 1$.

Так, на этапе пролиферации P/D^1 меняется в основном от 1 до 4 (табл. 1). Исключение составили клетки из КМ № 3.3, P/D^1 которых уменьшается от 11 до 1, что занимает 3 сут до момента равновесия и перехода к этапу созревания. На этапе созревания P/D^2 колеблется от 0,1–1 до нового этапа пролиферации, где индексы $P/D^1 > 1$.

Это означает, что соотношение скоростей пролиферации и созревания – их индексы эффективности P/D и концентрации пролиферирующих и созревающих клеток и особенно СЯ являются весьма значимыми показателями ПД Ph^+ клеток.

В итоге попеременное чередование этапов пролиферации и созревания со сменой повышенных индексов эффективности на низкие приводит к умеренному росту и падению эффективности ПД Ph^+ клеток 3 типа и таким образом регулирует эффективность ПД. Этой регуляции на этапах пролиферации соответствует повышенное содержание пролиферирующих клеток и особенно миелоцитов, низкое содержание нейтрофилов при индукции апоптоза, а также $P/D^1 > 1$. На этапах созревания регуляция ПД опосредуется ростом концентрации созревающих нейтрофилов, особенно СЯ с ингибированием пролиферации, аналогично Ph^+ клеткам 2 типа [3], меньшими концентрациями незрелых по сравнению с данными на этапе пролиферации. Показатели чередования этапов ПД по схеме 1/2 или 1/2/1 отличаются от чередования по схеме 2/1 или 2/1/2, начинающегося в культуре с этапа созревания, пониженными индексами P/D^2 на этапах созревания (рис. 1–5 и рис. 6–8, табл. 1).

Другие характеристики этапов чередования

Для ПД Ph^+ клеток 3 типа, как и 1 и 2 типов наблюдается общее свойство, наблюдаемое при культивировании Ph^+ клеток от больных ХФ ХМЛ, а именно рост популяции лейкоцитов и гранулоцитов с 1–4-кратным увеличением количества клеток на 2–5 сут ПД. Затем наступает уменьшение популяции и вновь ее небольшой рост на 7 сутки (или перегиб на кривой роста) (рис. 1 *в*; 3 *в*, *е*; 7 и 8 *в*). Последнее свидетельствует об активации пролиферации на следующем цикле дифференцировки Ph^+ клеток аналогично [2; 8]. Значительное уменьшение концентрации мононуклеаров ко второму циклу не препятствует чередованию этапов ПД с разными скоростями накопления P и D клеток. Рост популяции лейкоцитов при ПД Ph^+ клеток 3 типа происходит как в результате пролиферации незрелых, так и созревания нейтрофилов и их накопления из-за блокирования апоптоза. Это видно при дифференцировке гранулоцитов на рис 1–6, *б*, демонстрирующих неравномерное накопление СЯ и других нейтрофилов, ингибирующих накопление пролиферирующих клеток и миелоцитов на этапе созревания.

На рис. 1–6 и табл. 1 видно, что на этапах пролиферации концентрация незрелых Ph^+ клеток больше, чем на этапах созревания при индексах $P/D > 1$ (3,4–1,0 и 11 в случае КМ № 3.3). Концентрация созревающих нейтрофилов и СЯ при этом ниже, чем на этапе созревания. Соответственно на этапе созревания эти показатели имеют противоположные значения: $P/D < 1$, концентрация нейтрофилов и СЯ больше, а концентрация незрелых и миелоцитов меньше, чем на этапе пролиферации. Соотношение СЯ/миелоциты изменяется от 0,2 до 9 в зависимости от образцов Ph^+ клеток и времени ПД.

На 1 этапе однократного чередования 1/2 видно повышенное содержание пролиферирующих клеток в фазах клеточного цикла $S+G2/M > 30–45\%$ на 1–2 сут (рис. 1 и 2), что соответствует повышенному накоплению миелоцитов и низкому содержанию нейтрофилов: ММ, ПЯ и СЯ (Рис. 1, 2 и табл. 1). На этапе созревания индекс $P/D^2 \leq 1$, концентрация нейтрофилов и СЯ повышается, миелоцитов падает, содержание Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла $S+G2/M$ оказывается $\leq 25\%$.

Позже с переходом на этап созревания содержание миелоцитов падает ($< 20\%$), а нейтрофилов возрастает. К моменту второй активации пролиферации – к 7 суткам, наблюдается рост клеток в $S+G2/M$ фазах (рис. 1 *з*). Если наступает следующий этап 1 пролиферации (1/2/1), то соответствующие показатели предшествующего этапа пролиферации восстанавливаются (рис. 1–8 и табл. 1). Чередование этапов пролиферации и созревания по показателям аналогичны ПД Ph^+ клеток 1 и 2 типов соответственно, но ПД Ph^+ клеток 3 типа ограничивается краткой продолжительностью пребывания Ph^+ клеток в данных условиях и сменой этапов чередования. Результатом оказываются умеренные колебания индексов эффективности ПД.

При чередовании по схеме 1/2/1 на этапах пролиферации максимальное накопление принадлежит миелоцитам. На этапах созревания накопление нейтрофилов ММ, ПЯ и СЯ больше, чем миелоцитов. Все исследованные показатели чередования по мере перехода от пролиферации к созреванию изменяются и проходят через соответствующие максимумы и минимумы на своих этапах чередования (рис. 1–8, табл. 1) и практически восстанавливаются на своем этапе чередования при достаточной его продолжительности.

Дифференцировка субпопуляций гранулоцитов показывает изменение накопления миелоцитов, содержание которых на этапах пролиферации остается наибольшим.

На этапах созревания высокая концентрация нейтрофилов и СЯ соответствует очень низким значениям P/D^2 и минимальной концентрации миелоцитов (рис. 6–8 и табл. 2). Затем с падением концентрации СЯ начинается рост P/D^1 , накопление миелоцитов и индукция апоптоза. Максимумы P/D^1 и накопления миелоцитов совпадают с минимумом концентрации СЯ на 5-е сутки. Накопление зрелых клеток и СЯ ведет к падению P/D^1 и уменьшению концентрации миелоцитов. СЯ в высокой концентрации ингибируют пролиферацию миелоцитов, вероятно, по механизму обратной связи, что понижает индекс P/D . Именно уменьшение концентрации нейтрофилов и особенно СЯ определяет переход этапа созревания к этапу пролиферации при чередовании этапов 2/1, вероятно благодаря индукции апоптоза. Это вполне согласуется с характеристикой ПД Ph^+ клеток 2 типа [3] и клеток других больных с 3 типом дифференцировки по схеме 2/1/2 (рис. 7 *б–в*, *д*; 8 *б–в*; табл. 1 и 2). Ингибирование апоптоза и пролиферации миелоцитов клетками СЯ видно на рис. 3–5, 6–8 *б*, *з* и в табл. 1. При этом, чем активнее пролиферация Ph^+ клеток и активнее апоптоз, тем выше индекс P/D^1 , например рис. 3–5 и табл. 1.

Особенность ПД Ph^+ клеток по схеме 2/1–2/1/2/1 (рис. 6–8; другие примеры в табл. 1) состоит в быстром и значительном накоплении СЯ в начале этапа созревания и в зависимости дальнейшей пролиферации и дифференцировки клеток от уменьшения концентрации СЯ. Это можно объяснить накоплением ММ, ПЯ и СЯ в пробе Ph^+ клеток из-за торможения дифференцировки и ингибирования апоптоза нейтрофилами в предыдущем цикле дифференцировки функционировавшего клона. При чередовании по схеме 2/1, 2/1/2 или 2/1/2/1, виден обычный рост пролиферации лейкоцитов с двумя максимумами: активным – на 1 сутки и пассивным – на 5–8 сутки. Апоптоз и гибель клеток с максимумом на 2–5 сут составляет $\sim 35\%$ (рис. 6, *а–в*), что по времени соответствуют расходованию и гибели СЯ.

Показатели чередования этапов пролиферации и созревания при пролиферации и дифференцировке в культуре Rh^+ клеток 3 типа, полученных из КМ и ПК больных ХМЛ в хронической фазе. Данные Rh^+ клеток и больших ХМЛ приведены в табл. 3 сообщения 1 [8]

№ п/п и рис.№	№ ХМЛП (*)	Показатели этапа пролиферации Мах или интервал (сут)				Показатели этапа созревания Min, мах или интервал (сут)				[СЯ]/ [миелоцитов]	Апоптоз(гибель), %
		P/D ¹		10 ⁶ клеток/мл		P/D ² Min		Мах, 10 ⁶ клеток/мл			
				[нз]	[з]			[СЯ]	[нз]		
Чередование этапов по схемам 1/2 или 1/2/1 с изменением скоростей накопления и концентраций [нз] > [з] → [з] > [нз] → [нз] > [з]											
1. Рис. 1	3.1 КМ (1/2/1)	1,4-1,1 1,2-2,3	0,35-0,5 0,64- 0,5	0,29-0,5 0,63-0,2	0,1-0,25 0,3-0,1	0,9 (3 сут)	0,71 (3сут)	0,8 (3 сут)	0,4 (3 сут)	0,5-0,2	5-12
2. Рис. 2	3.2** ПК (1/2)	1,3-1,2	0,4	0,30	0,05	0,85	0,4-0,3	0,53	0,16	0,5-0,25	< 5
3-4. Рис. 3	3.3 КМ ПК (1/2)	1,1- 2 1,32-1,5	0,46-0, 0,5-0,8	0,02-0,5 0,4-0,5	0,01-0,4 0,14-0,25	0,1 1,0-0,2	0,5-0,1 0,5-0,1	0,6 (3 сут) 0,6 (7сут)	0,4-0,2 0,3-0,2	0,1-2,5 0,1-1-2,5	(7 на 11 сут)
5. Рис. 4	3.4 КМ (1/2/1)	1,2 1,53	0,4-0,8-0,5-1,1	0,34	0,17	0,52-0,34	0,57-0,34	1,1	0,7	0,4-1,3-2	(18 на 5 сут)
6. Рис. 5	3.5 КМ (1/2)	3,43-1,0	1,95	1,65	0,03-0,37	1,0-0,3	1,53-0,4	1,53-1,21	0,37-0,5	0,19-0,25-2,0	(30 на 11сут)
7.	3.6 КМ (1/2)	1,61	0,61	0,52	0,24	0,28	0,13-0,56	0,52-0,4-0,6	0,24	0,13 -0,5-1,0	(22 на 11 сут)
8.	3.7 КМ (1/2)	2,5-1,4	0,65-0,60	0,55	0,3	0,7-0,4	0,55	0,83	0,53	0,1-0,5	(30 -35 на 10-11 сут)
9.	2,2-1,2 ПК (1/2/1)	1,2-1,4	0,51-0,54 0,38-0,32	0,5-0,54 0,4-0,2	0,05-0,19 0,15-0,07	0,78	0,57-0,38	0, 73	0,27		
10.	3.8 КМ (1/2)	3,9-1,5	0,53-0,35	0,14-0,35	0,02-0,22	1,5-0,5	0,35-0,23	0,35-0,44	0,2-0,4	0,04-0,3	(45 на 7сут)
Чередование этапов по схемам 2/1 или 2/1/2 с изменением скоростей накопления концентраций [з] > [нз] → [нз] > [з] → [нз] > [з]											
11. Рис. 6	3.10* ПК (2/1)↔	1,4 -3,1-2,0	0,3-0,6-0,4	0,3-0,2	0,17-0,25	0,2-0,5-1,4	0,13-0,3	0,5-0,8-0,3	0,35-0,7	8,5-0,3	34-22 на 2-5 сут
12. Рис. 7	3.11 ПК (2/1/2) ↔	1,15-1,63	0,8-0,6	0,6-0,8-0,1	0,43-0,3	0,33-1,15 0,75-0,8	0,2-0,8, 0,6-0,8-0,1	0,5-1,3-0,8, 0,8-0,1	0,16-0,75-0,4, 0,39-0,06	1,2-0,2	35 на 1сут, 63 на 4 сут
13. Рис. 8	3.12 КМ (2/1/2/1/2) ↔	1,0-1,32 1,0	0,7-0,78 0,24	0,6 0,24	0,14-0,35 0,12	0,5-0,7-1,0 1,0-0,8-1,0	0,6-0,7 0,6 0,2	0,4-0,95 0,6	0,14-0,5 0,34 0,1	0,9-0,2	7, 22 на 6, 11 сут
14.	3.13 ПК (2/1) ↔	1,7-2,5	0,39	0,4-0,2	0,2-0,1	0,45-1,7	0,42	0,9-0,4	0,3-0,2	0,9-1-9	(48 на 8 сут)
15.	3.14 КМ (2/1) ↔	1,0-1,34	0,6-0,5	0,4	0,4-0,2	1,1-0,7	0,4-1,0	0,4-1,37	0,12-0,92	0,3-1,0	(45 на 5 сут)

*схема чередования; **фаза акселерации;
КМ – костный мозг, ПК– периферическая кровь;
[] – концентрация клеток;
– интервал значений на кинетической кривой.
↔ указывает, что для чередования 2/1 и 2/1/2/1 данные приведены вначале для 1 этапа и далее для этапа 2 в соответствии с подзаголовками таблицы.

Характеристика пересечений при чередовании этапов пролиферации и созревания Rh^+ клеток 3 типа, выделенных из костного мозга и периферической крови больных ХФ ХМЛ, в культуре. См. примечания к табл. 1.

№ п/п Рис. №	№ большого ХМЛ	Схема чередования этапов	Точки пересечения кривых скоростей накопления пролиферирующих [незрелых] (1этап) и созревающих клеток [зрелых] (2этап)			Концентрация клеток в точках пересечения, 10 ⁶ клеток /мл на этапах	
			Время пересечения, сут	Продолжительность этапов, сут 1 2	Индексы P/D в точках пересечения № 1 2 3	Незрелых и зрелых 1 2	Сегменты ядерных (СЯ) 1 2
1. Рис. 1	3.1 КМ	1/2/1	2 3,5	2 1,5 2,5	1,1 1,2-	0,5 0,65	0,24 0,34
2. Рис. 2	3.2 ПК	1/2	2,5-	2,5 > 4,5	1,06 - -	0,4 -	0,1 -
3-4. Рис. 3	3.3 КМ ПК	1/2 1/2	2,5 5,5	2,5 8,5 5,5 5,5	~ 2 - - 1,0 - -	0,49 - 0,53 -	0,26 - 0,38 -
5. Рис. 4	3.4 - КМ	1/2/1	0,2 6	~ 0,2 5,8	1,15 1,2 -	0,37 0,8	0,17 0,58
6. Рис. 5	3.5 КМ	1/2	5 -	5 3	1,0 - -	1,53 -	0,37 -
7.	3.6 КМ	1/2	4,5 -	4,5 3,5	1,06 - -	0,53 -	0,24 -
8. 9.	3.7 КМ ПК	1/2 1/2/1	2,5 - 2,5 8,5	2,5 8,5 2,5 8,5	1,5 - - 1,2 1,25 -	0,53 - 0,54 0,4	0,4 - 0,17 0,15
10.	3.8 КМ	1/2	5 -	5 > 2	1,5 - -	0,35 -	0,15 -
11. Рис. 6	3.10 ПК	2/1	3 -	4 3	1,4 - -	0,33 -	0,3 -
12. Рис. 7	3.11 ПК	2/1/2/1	5,5 7,5 11	2 5,5 0 3,5	1,15 1,15 0,80	0,75 0,6 0,1	0,43 0,3 0,06
13. Рис. 8	3.12 КМ	2/1/2/1/2	4,5 6 8	1,5 4,5 0 2,5 1	1,05 1,0 1,0 1,0	0,62 0,72 0,24 0,24	0,13 0,35 0,11 0,34
14.	3.13 ПК	2/1	4,0	1 4	1,7 - -	0,4	0,2
15.	3.14 КМ	2/1	4,0	1 4	1,0 - -	0,6	0,4

Среднее значение индекса эффективности P/D при пересечении кривых скоростей накопления на 1 и 2 этапах чередования 1,06 ± 0,23 (21,7 %)

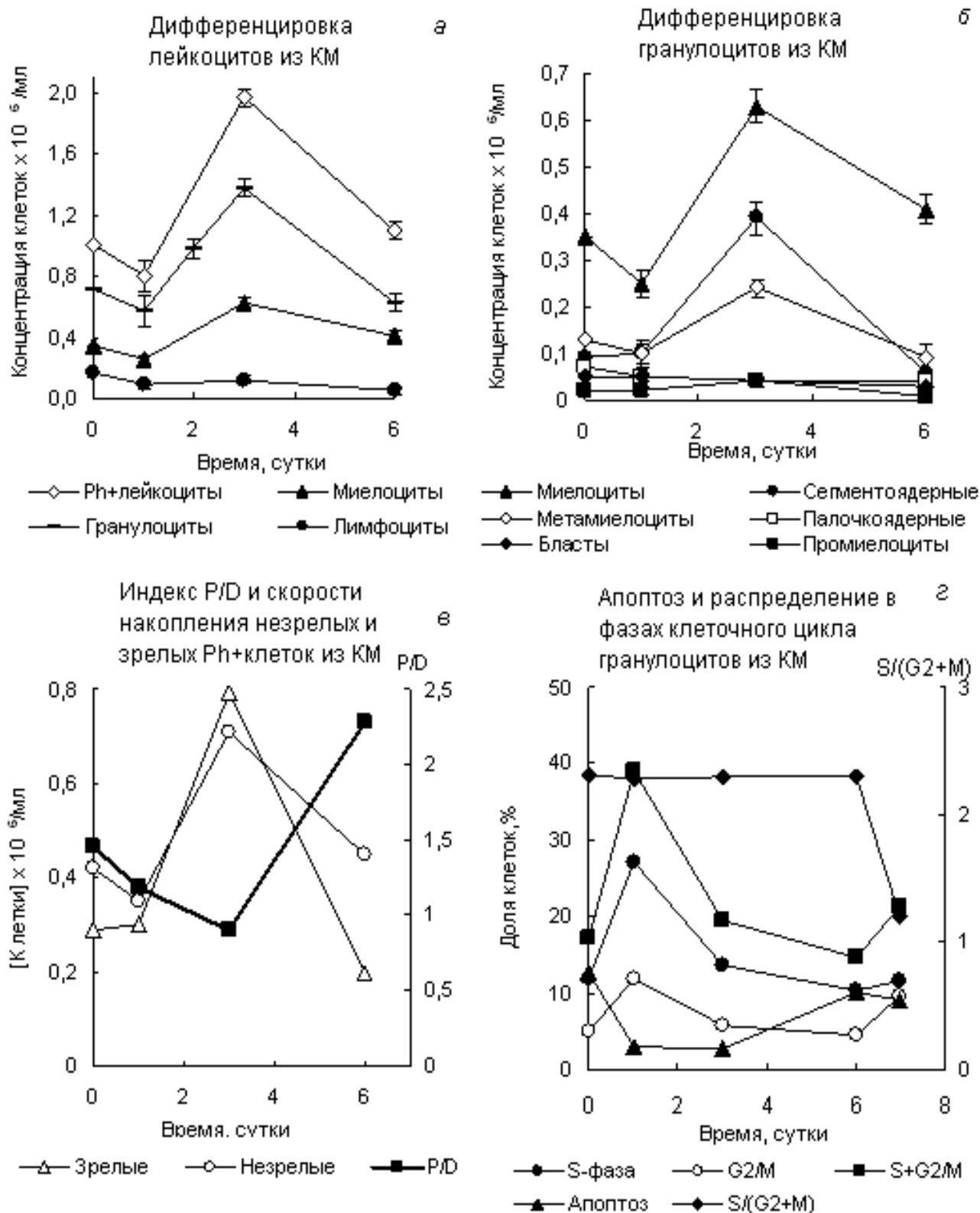


Рис. 1. Чередование этапов «преимущества пролиферации» и «преимущества созревания» по схеме 1/2/1 согласно кинетическим кривым пролиферации и дифференцировки в культуре Rh⁺ клеток (мононуклеаров), выделенных из КМ больного ХФ ХМЛ № 3.1 при установлении диагноза:

- (а) – Дифференцировка (накопление и расходование) лейкоцитов;
- (б) – Дифференцировка (накопление и расходование) гранулоцитов;
- (в) – Индексы эффективности P/D, скорости пролиферации незрелых пролиферирующих клеток и созревания нейтрофилов (зрелых);
- (г) – Апоптоз и распределение гранулоцитов в фазах клеточного цикла.

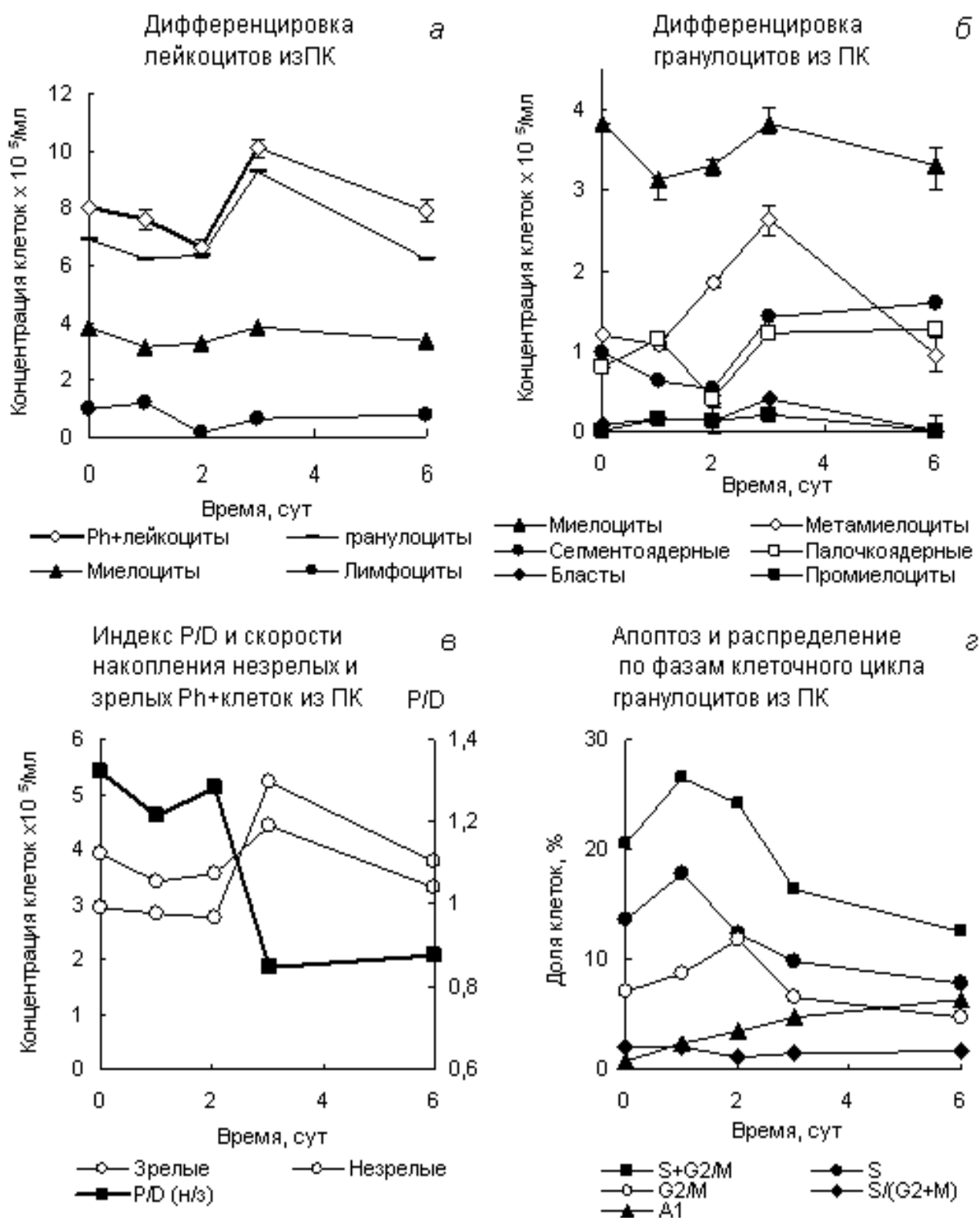


Рис. 2. Чередование этапов пролиферации и созревания по схеме 1/2 согласно кинетическим кривым пролиферации и дифференцировки Rh⁺клеток из ПК от больного в ХФ ХМЛ № 3.2 в культуре:

- (а–б) – Дифференцировка лейкоцитов, гранулоцитов;
 (в) – Индексы эффективности P/D и скорости накопления пролиферирующих незрелых и зрелых – созревающих без деления нейтрофилов;
 (г) – Апоптоз и распределение гранулоцитов в фазах клеточного цикла.

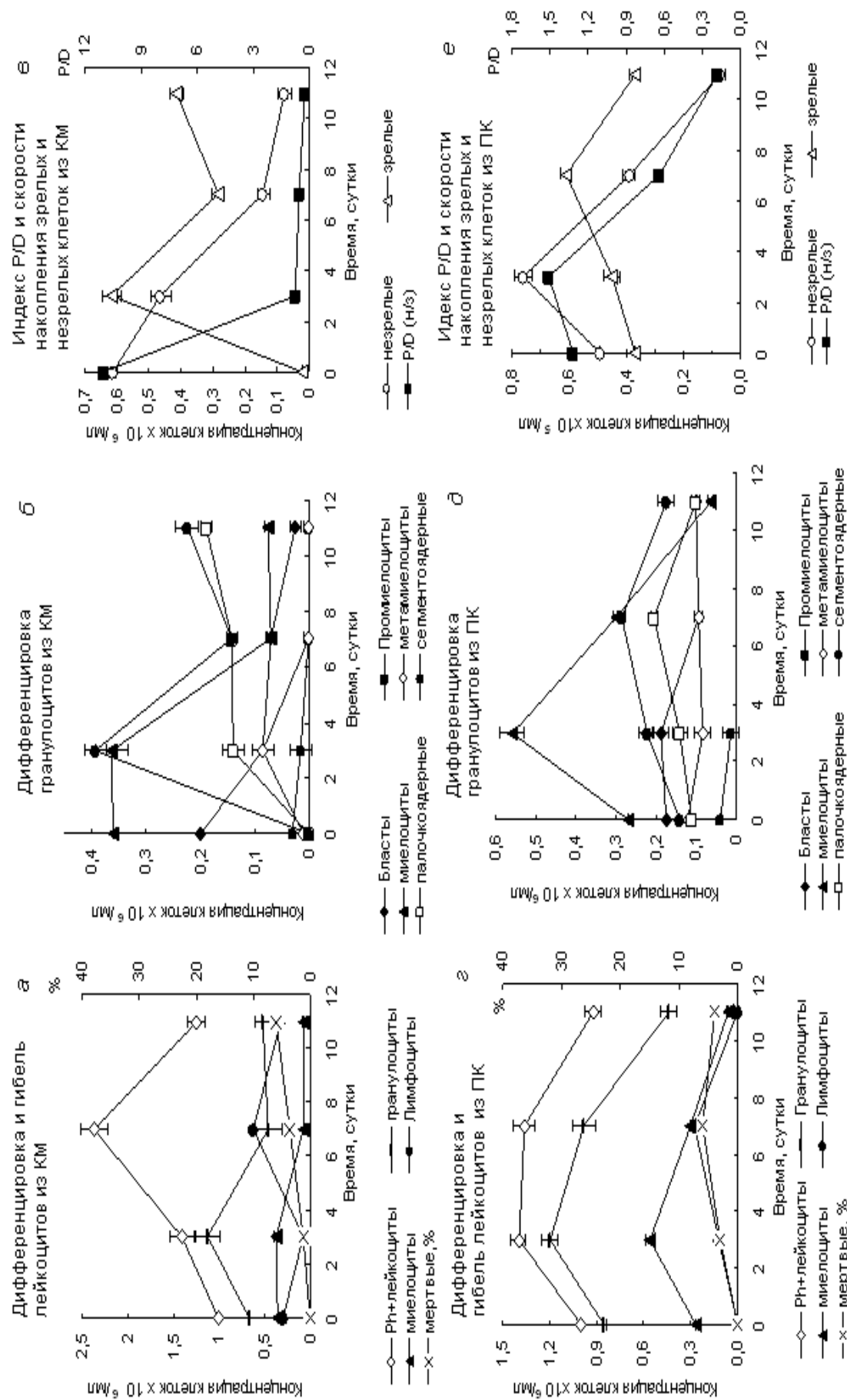


Рис. 3. Чередование этапов пролиферации и созревания (схема 1/2) по кинетическим кривым пролиферации и дифференцировки Ph^+ клеток из КМ (а-в) и ПК (г-е) от ХФ ХМЛ № 3.3 в культуре:

(а, г) – Дифференцировка лейкоцитов.

(б, д) – Дифференцировка гранулоцитов.

(в, е) – Индексы эффективности R/D, скорости пролиферации и созревания.

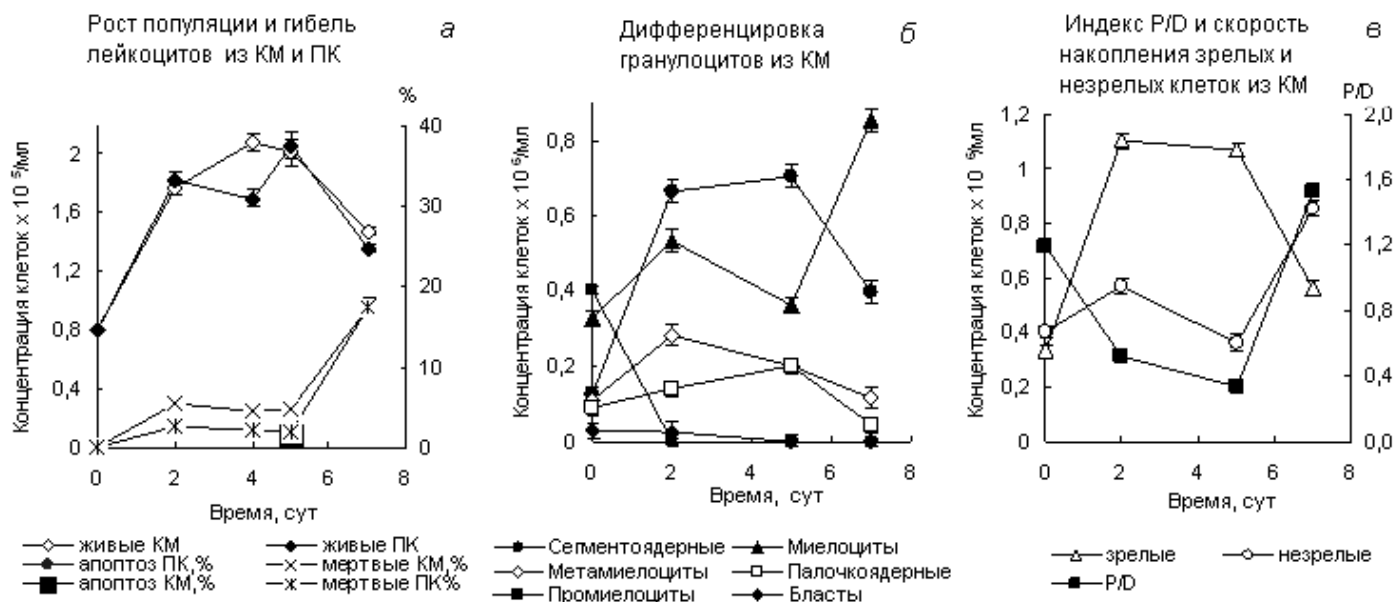


Рис. 4. Чередование этапов пролиферации и созревания (схема 1/2) по кинетическим кривым пролиферации и дифференцировки Ph^+ клеток из КМ от больного в ХФ ХМЛ № 3.4 в культуре:

- (а) – Рост и гибель популяции лейкоцитов из КМ и ПК.
 (б) – Дифференцировка Ph^+ гранулоцитов из КМ.
 (в) – Индексы P/D и скорости пролиферации незрелых и созревания нейтрофилов.

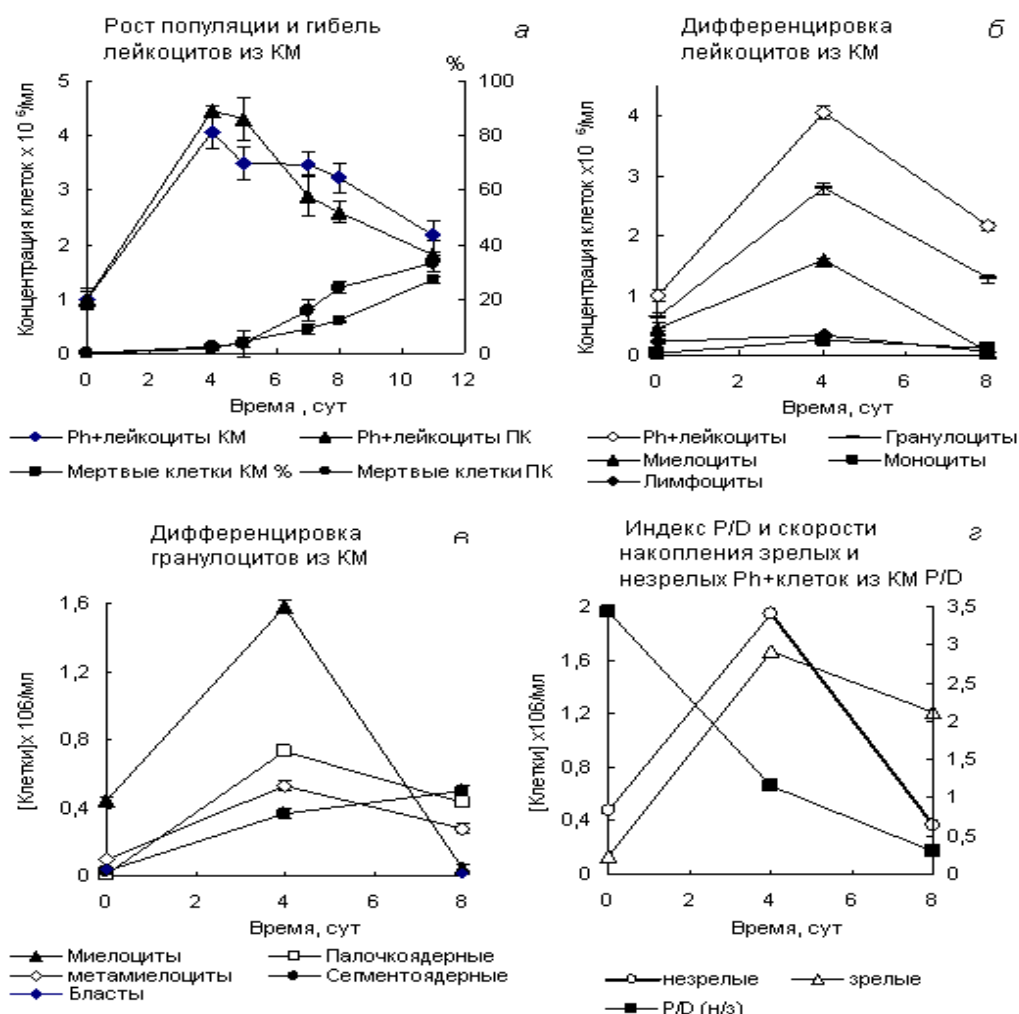


Рис. 5. Чередование этапов пролиферации и созревания (схема 1/2) по кинетическим кривым пролиферации и дифференцировки Ph^+ клеток из КМ (а) от больного ХФ ХМЛ № 3.5 в культуре:

- (а) – Рост и гибель Ph^+ клеток.
 (б) – Дифференцировка Ph^+ лейкоцитов.
 (в) – Дифференцировка Ph^+ гранулоцитов.
 (г) – Индексы эффективности P/D и скорости пролиферации незрелых и созревания нейтрофилов.

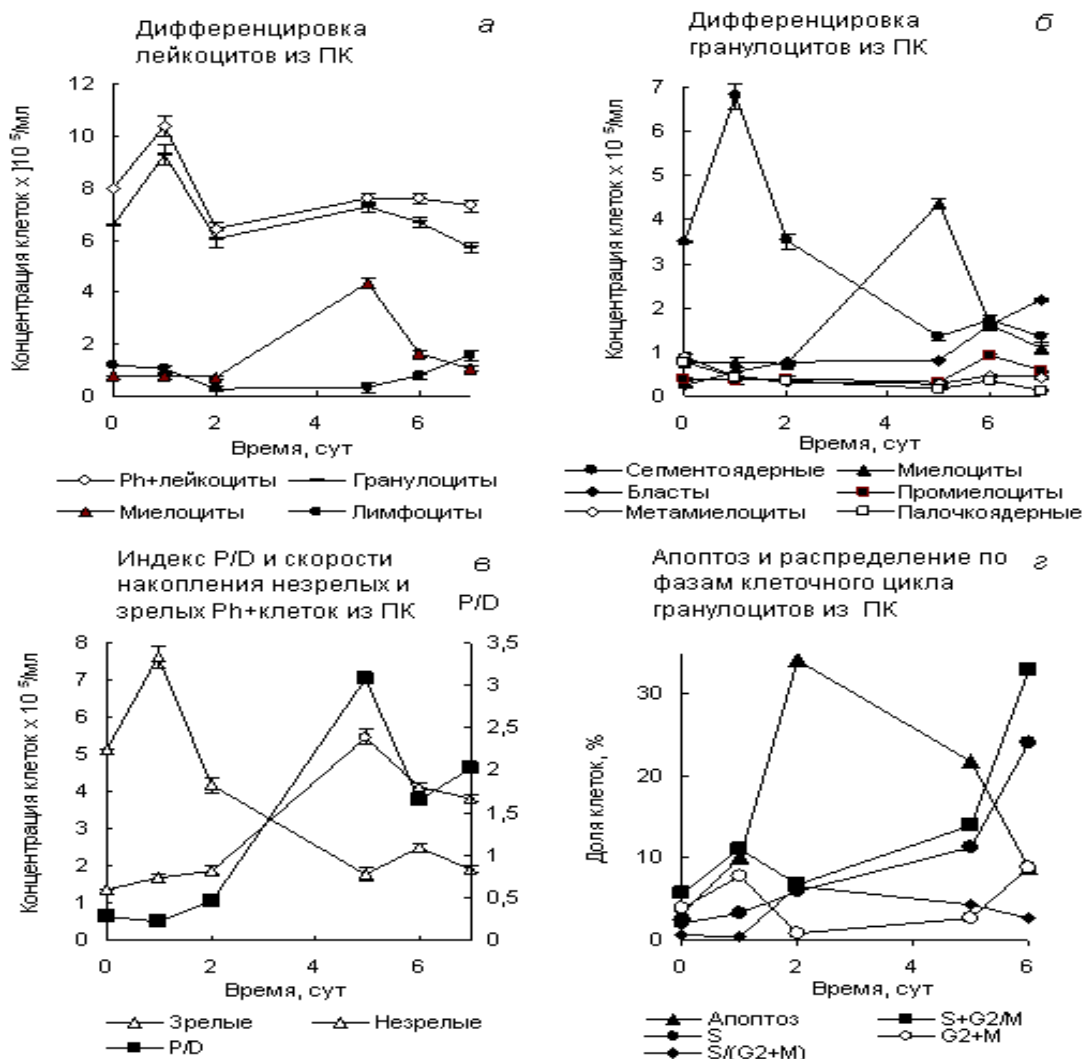


Рис. 6. Чередование этапов пролиферации и созревания по схеме 2/1 согласно кинетическим кривым пролиферации и дифференцировки Rh⁺клеток из ПК от больного в ХФ ХМЛ № 3.10 в культуре:

- (a) – Дифференцировка лейкоцитов.
 (б) – Дифференцировка гранулоцитов.
 (в) – Индексы эффективности P/D и скорости пролиферации незрелых и созревания нейтрофилов.
 (г) – Апоптоз и распределение гранулоцитов в фазах клеточного цикла.

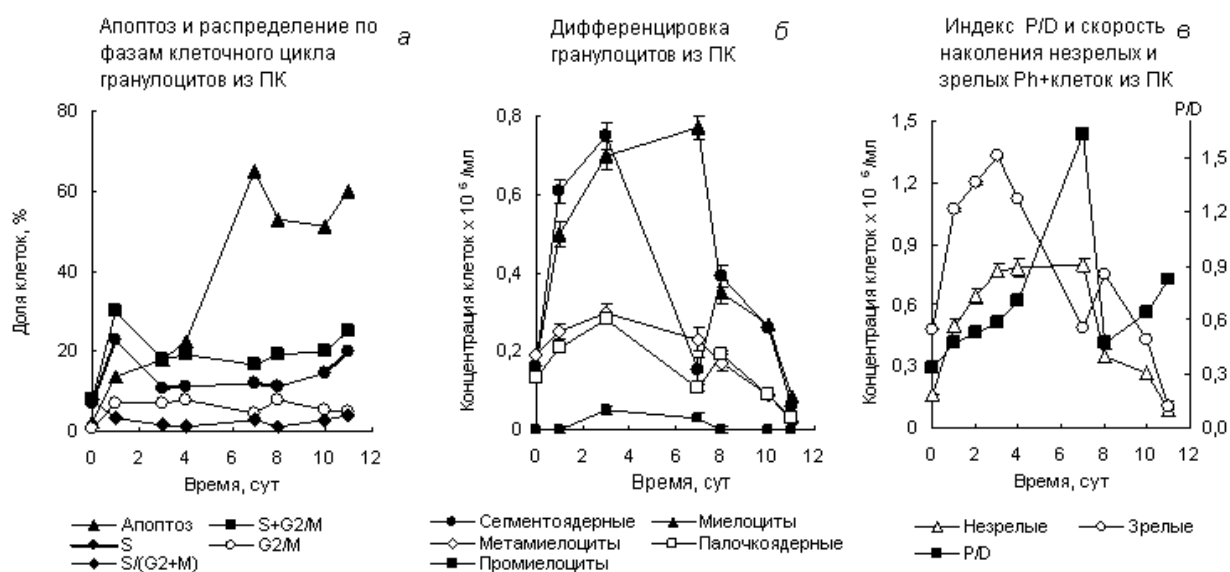


Рис. 7. Чередование этапов пролиферации и созревания по схеме 2/1/2 согласно кинетическим кривым пролиферации и дифференцировки Rh⁺клеток из ПК от больного в ХФ ХМЛ № 3.11 в культуре:

- (a) – Апоптоз и распределение гранулоцитов по фазам клеточного цикла.
 (б) – Дифференцировка гранулоцитов.
 (в) – Индексы эффективности P/D и скорости пролиферации незрелых клеток и созревания нейтрофилов.

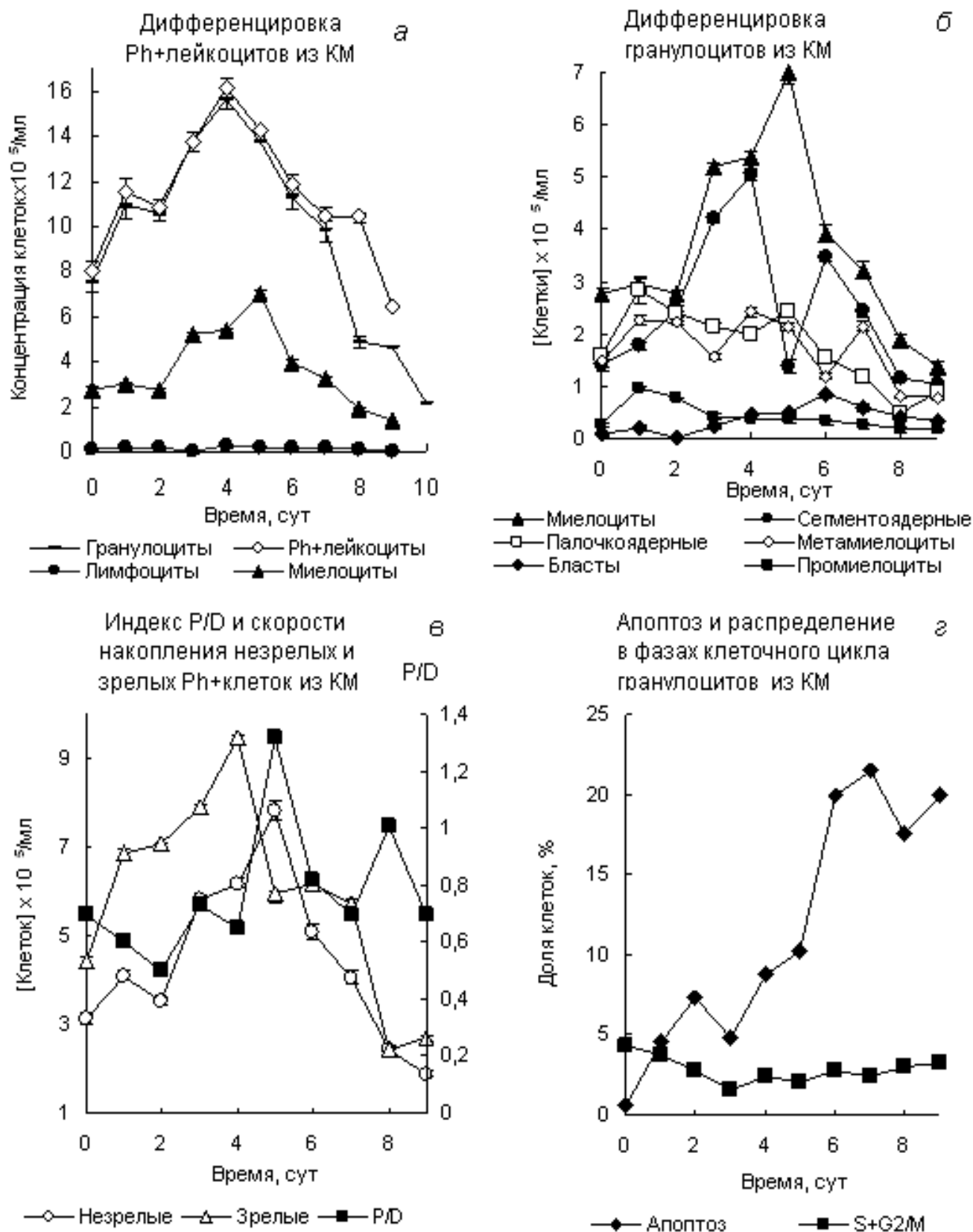


Рис. 8. Чередование этапов пролиферации и созревания по схеме 2/1/2/1 согласно кинетическим кривым пролиферации и дифференцировки Rh⁺клеток из КМ от ХФ ХМЛ № 3.12 в культуре:

- (а) – Дифференцировка Rh⁺лейкоцитов.
 (б) – Дифференцировка Rh⁺гранулоцитов.
 (в) – Индексы P/D и скорости пролиферации незрелых и созревания нейтрофилов
 (г) – Апоптоз и распределение гранулоцитов в фазах клеточного цикла.

Первый максимум роста клеток на 2 этапе связан с накоплением и расходом СЯ; второй максимум пролиферации Ph^+ клеток наблюдается уже при переходе к этапу пролиферации по мере значительной гибели СЯ (рис. 6 в). На 6–7 сутки пролиферируют миелоциты и истощаются нейтрофилы.

Доля клеток в фазах клеточного цикла также зависит от накопления СЯ. Повышенное накопление СЯ при начальном 2 этапе соответствует пониженному пролиферативному пулу $S+G_2/M$ клеток < 30 % на 1 сут (клетки из ПК ХМЛ) и < 20 % для клеток из КМ ХМЛ (рис. 7 а) и вместе с падением P/D^2 указывает на ингибирование пролиферации Ph^+ клеток СЯ нейтрофилами. На 2–10 сут культивирования, т.е. при переходе к этапу пролиферации с ростом индекса P/D^1 , доля клеток фазах $S+G_2/M$ < 20 % (клетки из ПК) и < 10 % для клеток из КМ (рис. 7). Это указывает на ингибирование пролиферации всех Ph^+ клеток под действием СЯ в высокой концентрации, как и для ПД Ph^+ клеток 2 типа [3].

Нестабильность эффективности пролиферации в терминах соотношения клеток в S и $S+G_2/M$ фазах клеточного цикла отмечена ранее при ХМЛ [9].

Апоптоз и гибель клеток при чередовании этапов ПД

Апоптоз на этапе созревания ингибирован, но он снова индуцируется на следующем этапе пролиферации, на котором концентрация СЯ активно уменьшается. С усилением апоптоза видна тенденция роста пролиферации на 10–11 сут. Апоптоз при этом возрастает от 10 % до 60 %, уменьшая концентрацию СЯ в 5 раз (от 0,7 до $0,15 \times 10^6$ клеток/мл). Отметим, что при концентрации СЯ > $(0,3-0,9) \times 10^6$ клеток/мл на этапе созревания при чередовании по схеме 2/1/2 видны блокирование апоптоза, активация накопления СЯ (табл. 2 №№ 3.10–3.14) и ингибирование пролиферации и особенно миелоцитов, как и при ПД Ph^+ клеток 2 типа [3]. Так, на рис. 6. б, г, видно существенное подавление пролиферации нейтрофилами СЯ в высокой концентрации ($0,7 \times 10^6$ клеток/мл) на этапе созревания. В течение ~ 3 сут пролиферация всех клеток в фазах $S+G_2/M$ ниже 10 % (падает в 2,5–3 раза). Концентрация миелоцитов при этом падает ниже $0,1 \times 10^6$ клеток/мл. При переходе к этапу пролиферации содержание СЯ уменьшается, накопление миелоцитов увеличивается в 4 раза и растет индекс P/D^1 . Также видно увеличение апоптоза до >30% на 2–5 сут одновременно с истощением СЯ. При ПД Ph^+ клеток № 3.10–3.14 видно эффективное ингибирование пролиферации клеток под действием высокой концентрации СЯ и/или всех созревающих нейтрофилов (рис. 6–8 и табл. 1). На рис. 7 а, г апоптоз достигает 60 % и поэтому ингибирование пролиферации миелоцитов нейтрофилами СЯ уменьшается. На рис 8 в, г при чередовании этапов 2/1/2/1 видно значительное ингибирование пролиферации и уменьшение P/D^2 до 0,1–0,9. За 11 суток в течение всех чередований 2/1/2/1 пролиферативный пул клеток в фазах клеточного цикла $S+G_2/M$ < 10 %. При низкой пролиферации на этапе созревания апоптоз ниже 10 % и его доля на 6–11 сут растет лишь до 20 % и только при переходе к 1 этапу. Общее пребывание Ph^+ клеток в условиях этапа созревания (рис. 8 и табл. 2) в три раза больше, чем на этапе пролиферации. Это приводит к самому значительному ингибированию пролиферации и апоптоза из исследованных Ph^+ клеток 3 типа. На рис. 7 а–в максимум апоптоза также соответствует минимуму СЯ и максимумам накопления миелоци-

тов и значений P/D , что также означает заметное ингибирование апоптоза клетками СЯ.

Согласно мнению Т.В. Ахлыниной и соавт., содержание СЯ $\geq 0,25-0,35 \times 10^6$ клеток/мл соответствует или даже ведет к подавлению апоптоза Ph^+ клеток 2 типа. Однако при ПД Ph^+ клеток 3 типа значительное подавление апоптоза происходит и при низкой [СЯ], если обеспечена высокая концентрация всех созревающих нейтрофилов:

$$(MM+ПЯ+СЯ = 0,6-1,3 \times 10^6 \text{ клеток/мл}).$$

Аналогичный эффект наблюдается также на рис. 8 при чередовании 2/1/2/1 (табл.1).

Роль чередования этапов ПД

Длительность этапов чередования, вероятно, также имеет значение для ПД Ph^+ клеток 3 типа. Продолжительность пребывания клеток на этапах пролиферации или созревания различна, но в сумме она больше на этапах пролиферации при чередовании по схеме 1/2/1 и меньше при чередовании 2/1/2 (табл. 2). При чередовании по схеме 2/1/2 пребывание на этапах созревания больше (4–9 сут), чем на этапах пролиферации, где оно ~ 1–3 сут (рис. 6 в, 7 в, 8 в и табл. 2).

При чередовании по схеме 1/2/1 продолжительность на этапах пролиферации составляет от 1 до 8 сут; на этапах созревания – от 3 до 8 сут, что зависит от исходных Ph^+ клеток, как и длительности этапов чередования.

На этапе созревания, кратко на рис. 2 и более продолжительно на рис. 1 и 3 видно, что с увеличением продолжительности этапа созревания усиливается ингибирование апоптоза, накопление СЯ (или всех нейтрофилов), ингибирование пролиферации и созревания Ph^+ клеток с уменьшением индекса P/D . Очевидно, что чем продолжительнее этап созревания, тем существеннее понижается эффективность ПД.

На 1-х этапах чередования 1/2 и 1/2/1 в начале цикла дифференцировки, когда наблюдается активация пролиферации на 1–3 сутки, видны разные, но часто повышенные значения P/D^1 11; 3; 3,5; 2,5; 3,8–3,9 (табл. 1 образцы № 3.3, 3.5, 3.7 и 3.8). 1-й этап, следующий после этапа 2 с низкими P/D^2 , имеет меньший индекс P/D^1 от 1,0 до 2,4 для разных образцов Ph^+ клеток и по времени соответствует второй активации пролиферации в начале второго цикла дифференцировки (рис. 1, 2, 6–8). Это повышение P/D^1 в начале 1 и 2 циклов дифференцировки по времени соответствует активной пролиферации в исследуемых Ph^+ клетках (на 1–3 и 6–8, 11–14 сутки). Оно предполагает зависимость регуляции 1 этапа пролиферации от содержания и пролиферативного потенциала миелоидных CD34 предшественников в Ph^+ клетках данного большого ХМЛ.

Судя по значениям P/D , пролонгирование этапа созревания способно подавить или отодвинуть следующий за ним этап пролиферации (табл. 2, № образцов 3.3, 3.7 КМ, 3.12).

Таким образом, чередование этапов ПД либо эффективной пролиферации Ph^+ клеток, либо эффективного созревания нейтрофилов, сменяющих друг друга с повышением или понижением эффективности P/D , участвуют в механизме регуляции и поддержания ПД в оптимальном режиме.

Нарушения механизма чередования, вероятно, являются причиной превращения ПД в одностадийную пролиферацию Ph^+ клеток 1 типа, ведущую к прогрессии ХМЛ, или к продолжительному этапу созревания Ph^+ клеток 2 типа со стойким угнетением пролиферации Ph^+ клеток [7; 3].

Инверсия порядка накопления нейтрофилов при ПД Ph^+ клеток 3 типа

При чередовании на этапах созревания наблюдается последовательная инверсия обычного порядка (последовательности) накопления нейтрофилов $\text{M} > \text{MM} > \text{ПЯ} > \text{СЯ}$ в $\text{M} > \text{СЯ} > \text{ПЯ} > \text{MM}$, аналогичная инверсии, наблюдаемой для ПД Ph^+ клеток 2 типа [3]. Инверсия видна на рис. 1 б, в, 2 б, в и на рис. 6–8 для чередований: $\text{M} > \text{MM} > \text{СЯ} > \text{ПЯ}$ в $\rightarrow \text{M} > \text{СЯ} > \text{MM} > \text{ПЯ}$ и снова $\rightarrow \text{M} > \text{MM} > \text{СЯ} \sim \text{ПЯ}$. Отметим, что при 1 типе дифференцировки наблюдается обычный порядок созревания: последовательности накопления $\text{M} > \text{MM} > \text{ПЯ} \geq \text{СЯ}$ без инверсии [8]. На этапах пролиферации Ph^+ клеток 3 типа – такой порядок также соблюдается.

Однако на этапах созревания рассматриваемых кинетических кривых ПД Ph^+ клеток 3 типа порядок накопления созревающих нейтрофилов изменяется. Скорость достижения максимумов на кинетических кривых СЯ, ПЯ и ММ замедляется, а накопление миелоцитов в области пиков нейтрофилов понижается. В максимуме накопления нейтрофилов наблюдается инверсия порядка (последовательности) накопления нейтрофилов. Последовательные изменения порядка накопления нейтрофилов по ходу дифференцировки видны на рис. 2–4, б, в. На рисунках видны частые изменения порядка накопления нейтрофилов с увеличением или уменьшением скоростей накопления, что показывают пересечения кривых накопления нейтрофилов с изменением направления и их пересечения. Однородные скорости накопления нейтрофилов на пересечении кривых позже на этапе пролиферации приводят к восстановлению обычного порядка накопления нейтрофилов, иногда неполного – $\text{M} > \text{MM} > \text{СЯ} \geq \text{ПЯ}$.

Совокупность этих результатов означает, что изменения порядка накопления, иными словами скоростей накопления нейтрофилов в сумме и относительно друг друга, происходят достаточно часто по ходу кинетических кривых накопления нейтрофилов. Восстановление обычного порядка накопления нейтрофилов соответствует повышению содержания миелоцитов, индекса эффективности Р/Д и способствует ускорению пролиферации. Изменение скорости и инверсия порядка накопления нейтрофилов, будучи синхронно уменьшению индексов эффективности Р/Д (рис. 2–4, а, б), указывает на непосредственное участие нейтрофилов в регуляции ПД Ph^+ клеток с нарушением созревания самих нейтрофилов и с ингибированием пролиферации нейтрофилами, особенно СЯ.

Инверсия порядка накопления нейтрофилов при ПД в условиях созревания Ph^+ клеток обнаружена впервые в [3]. Она оказывается еще одним интересным свойством ПД Ph^+ клеток 2 типа в культуре. Очевидно, что накопление СЯ в результате блокирования апоптоза по цепочке обратной связи ведет к последовательному накоплению предыдущих по ходу дифференцировки нейтрофилов ПЯ и ММ и к нарушению регуляции созревания самих нейтрофилов. Так, накопление СЯ ведет к ингибированию созревания ПЯ, а ПЯ в свою очередь угнетает дифференцировку ММ. В конце концов, тормозится вся цепь созревания нейтрофилов, что сопровождается накоплением избытка всех нейтрофилов. При этом созревающие нейтрофилы в повышенной концентрации угнетают пролиферацию и понижают эффективность ПД. По достижении некоторого «критического» значения концентрации нейтрофилов индуцируется апоптоз, что освобож-

дает нейтрофилы от пресса обратной связи с торможением созревания. В результате концентрация нейтрофилов падает, восстанавливается порядок их накопления и регуляция их созревания, что ведет к росту индекса эффективности Р/Д и активации этапа пролиферации Ph^+ клеток.

Отметим, что в 3 случаях обнаружены различия в типах ПД Ph^+ клеток из ПК и КМ от одного больного ХМЛ. Так для 3.6 КМ обнаруживается 3 тип с чередованием 1/2, а в клетках из ПК 3.6 реализуется 1 тип ПД [8]. По 3 типу дифференцировались Ph^+ клетки из КМ 3.4 и 3.5 (рис. 4 и 5, табл.2) с чередованием 1/2/1 и 1/2. Клетки из ПК от этих же больных ХМЛ дифференцировались по 2 типу [3]. Можно предположить, что в ПК Ph^+ клетки 3 из 34 образцов потеряли способность к чередованию этапов пролиферации и дифференцировки по сравнению с клетками из КМ и что такие клетки, возможно, быстрее перемещаются из КМ в ПК. При этом все исследованные Ph^+ клетки КМ 3 типа были способны к чередованию этапов, а также большая часть клеток из КМ и ПК ХМЛ одновременно сохраняла эту способность.

Третий тип оказывается наиболее распространенным; он встречается у ~50% проб КМ и ПК исследованных больных ХМЛ, из которых две трети составляют Ph^+ клетки с чередованием этапов 1/2 и 1/2/1.

Результаты исследования ПД Ph^+ клеток 3 типа от разных больных ХМЛ в культуре выявили клеточную регуляцию ПД с чередованием ее этапов и активным участием в этой регуляции блокирования апоптоза и ингибирования пролиферации Ph^+ клеток созревающими нейтрофилами. Такие особенности ПД и апоптоза гемопоэтических клеток ранее не рассматривались [1; 4–6; 10; 11; 15–17; 21; 22; 24; 26; 27; 30].

Роль сегментоядерных нейтрофилов и особенно СЯ в ингибировании пролиферации Ph^+ клеток 2 типа ранее рассмотрена в [3].

При дифференцировке Ph^+ клеток 1 типа ранее наблюдали высокий уровень экспрессии антигена CD34. Максимальные эффективность Р/Д и экспрессия онкогена bcr/abl совпадали [2; 7]. До этих исследований сведения о клеточной регуляции ПД Ph^+ клеток нейтрофилами, созревающими без деления, и о регуляции чередованием этапов с высокой и низкой эффективностью ПД отсутствовали.

Зависимость активности пролиферации лейкоцитов от фаз ХМЛ, особенно при БК, отмечена во многих работах [13; 19; 20; 29; 31; 38] и подтверждается нашими результатами, что подробно обсуждено в [3; 8].

При ПД Ph^+ клеток 1 и 2 типов наблюдаются необратимые процессы для ПД данного клона Ph^+ клеток, а при 3 типе изменения свойств остаются обратимыми, способными к чередованию типов ПД и к восстановлению свойств, изменяющихся на предыдущем этапе чередования. При 3 типе ПД Ph^+ клеток обнаруживается обратимое ингибирование пролиферации способных к делению Ph^+ клеток и обратимая инверсия обычного порядка созревания Ph^+ нейтрофилов под действием накопления СЯ и других нейтрофилов. Это предполагает, что генетическая регуляция ПД и чередование этапов пролиферации с созреванием опосредуются клеточной регуляцией ПД зрелыми Ph^+ нейтрофилами при участии апоптоза. Ph^+ клетки 3 типа по регуляции ПД, вероятно, ближе к норме, чем Ph^+ клетки 1 и 2 типа. При этом все три типа Ph^+ клеток, очевидно, зависят от особенностей bcr/abl, наследуемых Ph^+ клетками от разных больных ХМЛ.

Свойства ПД Ph^+ клеток 3 типа показывают, что чередование этапа эффективной пролиферации с этапом эффективного созревания нейтрофилов является механизмом регуляции эффективности ПД (индекса P/D) и поддержания параметров ПД в оптимальном режиме.

Нарушения этого режима происходят при ПД Ph^+ клеток 1 типа, которые ведут к прогрессии ХМЛ, или к ПД Ph^+ клеток 2 типа с угнетением пролиферации Ph^+ клеток соответственно [3; 8].

В работе А.М. Buckle и др. [12] при изучении клеточного цикла очищенных стволовых $CD34^+$ клеток от больных ХМЛ и от доноров показано, что стволовые Ph^+ клетки пролиферируют менее активно, чем стволовые клетки доноров, а более зрелые Ph^+ клетки накапливаются наоборот более активно. На этом основании авторы заключили, что причиной ХМЛ служит не управляемая экспрессией *bcr/abl* гена пролиферация Ph^+ клеток, а «дефект баланса самоподдержания и созревания этих клеток».

Противоречия в созревании нейтрофилов и ожидаемой активной пролиферацией Ph^+ клеток как первичного дефекта при ХМЛ активно обсуждались ранее при изучении колониобразования Ph^+ клеток от больных ХМЛ [14; 35; 36] и других последующих исследованиях [19; 20; 29; 37].

Полученные нами результаты подтверждают «дисбаланс» пролиферации клеток-предшественников и позже созревающих нейтрофилов и выявляют и объясняют механизм этого «дисбаланса», заключающегося в регуляции эффективности ПД Ph^+ клеток чередованием этапов эффективной пролиферации и эффективного созревания при блокировании апоптоза и ингибировании пролиферации накапливающимися нейтрофилами. При этом характер «дисбаланса» зависит от наследуемых Ph^+ клетками от разных больных ХМЛ особенностей с его мутациями и изменениями сигнальных путей трансдукции с участием тирозинкиназы p210. Роль экспрессии *bcr/abl* онкогена в активации пролиферации Ph^+ клеток достоверно доказана многими исследованиями [10; 11; 15–18; 21–28].

Мы также наблюдали значительную экспрессию *bcr/abl* гена при ПД Ph^+ клеток 1 типа № 1.1 [2] одновременно с ростом эффективности ПД и активной продукцией миелоидных $CD34^+$ клеток от этого больного ХМЛ [7].

Полученные результаты соответствуют данным [32] о корреляции экспрессии *bcr/abl* с накоплением пролиферирующих клеток-предшественников и инверсии этой корреляции вблизи этапа созревания и объясняют причину этой инверсии изменением механизма регуляции с активацией пролиферации при экспрессии *bcr/abl* онкогена на ингибирование пролиферации созревающими нейтрофилами в условиях блокирования апоптоза, что подробно обсуждается в [3]. Результаты перечисленных исследований в совокупности с нашими результатами способствуют формированию концепции клеточных и молекулярных механизмов ПД Ph^+ клеток *in vitro* для различных больных ХМЛ с их индивидуальными особенностями экспрессии *bcr/abl* онкогена.

Разработанный кинетический подход к исследованию ПД Ph^+ клеток от индивидуальных больных ХМЛ и полученные результаты позволяют оценивать эффективность ПД, пролиферативный потенциал Ph^+ клеток *ex vivo* и судить о способности Ph^+ клеток данного больного ХМЛ к прогрессии ХМЛ *in vivo* от момента отбора пробы до экспансии агрессивного мутантного клона. Предлагаемый подход может также служить элементом новой информативной модельной системы для изучения

лейкозов *in vitro*, пригодной для суждения о процессах *in vivo*, а также для оценки терапевтического эффекта новых и известных препаратов на разные этапы ПД Ph^+ клеток трех различающихся типов от индивидуальных больных ХМЛ.

Заключение

Обнаружена и исследована клеточная регуляция ПД Ph^+ клеток 3 типа, которая осуществляется при чередовании этапов эффективных пролиферации и созревания с ингибированием пролиферации накапливающимися нейтрофилами при блокировании апоптоза.

При ПД Ph^+ клеток 3 типа происходит неоднократное чередование этапов преимущественной пролиферации и преимущественного созревания, каждый из которых аналогичен ПД Ph^+ клеток 1 и 2 типов соответственно.

На этапе пролиферации скорость накопления пролиферирующих клеток выше скорости накопления созревающих без деления нейтрофилов. На этапе созревания, наоборот, скорость накопления нейтрофилов выше скорости пролиферации. При этом индекс эффективности P/D – соотношение скоростей пролиферации и созревания выше $\geq$ или ниже ≤ 1 . Кинетические кривые показателей чередования пролиферации и созревания пересекаются и в точках пересечения (контрольные или равновесные точки) имеют одинаковые значения, так индекс P/D равен $1,06 \pm 0,23$ и не зависит от времени и последовательности чередования, а также от источника Ph^+ клеток – разных больных ХМЛ.

На этапах чередования показатели напротив постоянно изменяются, увеличиваясь, уменьшаясь или проходя минимумы и максимумы. При возвращении к своему этапу чередования показатели восстанавливаются.

На этапе пролиферации P/D > 1, содержание незрелых Ph^+ клеток – миелоцитов и клеток в фазах клеточного цикла S+G₂/M повышено, а зрелых нейтрофилов понижено. Апоптоз при этом индуцирован. При чередовании на этапах созревания, напротив, блокируется апоптоз, уменьшается эффективность P/D ≤ 1 и содержание незрелых и миелоцитов. В результате повышается накопление созревающих нейтрофилов, особенно СЯ, ингибируется пролиферация Ph^+ клеток и уменьшается доля клеток в фазах клеточного цикла S+G₂/M. В этих условиях инвертирует порядок (последовательность) накопления нейтрофилов в ряду от М > ММ > ПЯ > СЯ до СЯ > ПЯ > ММ > М и нарушается созревание нейтрофилов.

Чередование этапов ПД эффективной пролиферации и эффективного созревания нейтрофилов участвует в механизме клеточной регуляции эффективности P/D и поддержания ПД в оптимальном режиме. Механизм регуляции на этапе созревания опосредован ингибированием пролиферации миелоидных клеток-предшественников и нарушением созревания нейтрофилов накапливающимися в избытке нейтрофилами, особенно СЯ, при блокировании апоптоза. Ph^+ клетки 3 типа обнаружены у половины исследованных больных ХМЛ, все в ХФ ХМЛ. Ph^+ клетки 1 типа (~20 %) выделены от больных в прогрессирующих фазах ХМЛ, Ph^+ клетки 2 и 3 типов (~30 и 50 %) – от больных в хронической фазе ХМЛ с положительной реакцией на химиотерапию ХМЛ.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 06-04-08372-офи.

Литература

1. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С., Рукавицын О.А. Хронический миелолейкоз. – СПб: Специальная литература, 1998. – 463 с.
2. Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Саркисян Г.П. и др. Кинетика пролиферации, дифференцировки и транскрипции генов, регулирующих апоптоз, BCR/ABL⁺Ph⁺ клеток человека в культуре // Цитология. – 2007. – Т. 49. – С. 889–900.
3. Ахлынина Т.В., Гринева Н.И., Герасимова Л.П. и др. Различия в пролиферации и дифференцировке Ph⁺клеток в культуре. 2. Ph⁺клетки с низкой эффективностью пролиферации и способностью блокировать апоптоз // Российский биотерапевтический журнал – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 3–12.
4. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптоза клеток крови // Лабораторная медицина. – 2001. – № 4. – С. 47–54.
5. Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста. В кн. Биологические основы противоопухолевой терапии. – М.: Агат-Мед, 2001. – С. 5–32.
6. Руководство по гематологии под ред. А.И.Воробьева. – Т. 1. – М.: Ньюдиамед, – 2002. – 280 с.
7. Гринева Н.И., Барышников А.Ю., Герасимова Л.П. и др. Кинетика экспрессии антигенов в процессе пролиферации и дифференцировки Ph⁺клеток периферической крови при хроническом миелолейкозе в культуре // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 21–32.
8. Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П. и др. Различия в пролиферации и дифференцировке Ph⁺клеток от разных больных ХМЛ в культуре. 1. Три типа Ph⁺клеток при ХМЛ. Пролиферация и дифференцировка Ph⁺клеток с высокой эффективностью // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 10, № 4. – С. 53–68.
9. Шмаров Д.А., Кучма Ю.М., Козинец Г.И. Изменение стабильности параметров клеточного цикла клеток костного мозга при гематологических заболеваниях // Терапевт. Архив. – 1997. – № 7. – С. 17–21.
10. Bedi A., Zehnbauser B.A., Barber J. et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents // Blood. – 1994. – Vol. 83. – P. 2038–44.
11. Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C et al. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in CML//Blood. – 1995. – Vol. 86. – P. 1148–58.
12. Buckle A.M., Mottram R., Pierce A. et al. The effect of Bcr-Abl protein tyrosine kinase on maturation and proliferation of primitive haematopoietic cells // Mol. Med. – 2000. – Vol. 6. – P. 892–902.
13. Clarkson B., Strife A. Linkage of proliferative maturational abnormalities in CML and relevance to treatment // Leukemia. – 1993. – Vol. 7. – P. 1683–721.
14. Clarkson B., Strife A., Perez A. et al. Integration of molecular and biological abnormalities in quest for selective treatment of CML // Leukemia & Lymphoma. – 1993. – Vol. 11. – P. 81–100.
15. Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. Structural and signaling requirements for bcr-abl-mediated transformation and inhibition of apoptosis // Mol. cell. biology. – 1995. – № 10. – P. 5531–41.
16. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia//Blood. – 2000. – Vol. 96. – P. 3343–56.
17. Deininger M.W.N., Vieira S., Mendiola R. et al. BCR/ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia // Cancer research. – 2000. – Vol. 60. – 2049–55.
18. Era T., Witte O.N. Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 1737–42.
19. Golde D.W., Cline M.J. Human preleukemia: identification a maturation defect in vitro//New Engl. J. Med. – 1973. – Vol. 288. – P. 1083–6.
20. Golde D.W., Byers L.A., Cline M.J. Chronic myelogenous leukemia cell growth and maturation in liquid culture // Cancer Research. – 1974. – Vol. 34. – P. 419–23.
21. Guzman M.L., Jordan C.T. Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia//Cancer Control. – 2004. – Vol. 11, № 2. – P. 97–104.
22. Holyoake T.L., Jiang X., Eaves A.C., Eaves C.J. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia // Leukemia. – 2002. – Vol. 16. – P. 549–58.
23. Holyoake T.L., Jiang X., Jorgensen H.G. et al. Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth in vitro in association with up-regulation of expression of inter-leukin-3 // Blood. – 2001. – Vol. 97. – P. 720–8.
24. Jaiswal S., Traver D., Miyamoto T. et al. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 10002–7.
25. Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Dylla S.J. et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast crisis CML // New England J Med. – 2004. – Vol. 351. – P. 657–67.
26. Lotem J., Sachs L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes // Leukemia. – 1996. – Vol. 10. – P. 925–31.
27. Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products // Science. – 1990. – Vol. 247. – P. 1079–82.
28. Melo J.V. The diversity of the BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype // Blood. – 1996. – Vol. 88. – P. 2375–84.
29. Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells via activation of STAT3 // Genes & Development. – 1998. – Vol. 12. – P. 2048–60.
30. Ogawa M., Fried J., Sakai Y. et al. Studies of cellular proliferation in human leukemia. V1.The proliferative activity, generation time, and emergence time of neutrophilic granulocytes in CML // Cancer. – 1970. – Vol. 25. – P. 1031–49.
31. Passegué E., Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Weissman I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? // Proc.Nat.Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 11842–9.
32. Perry S., Moxly J.H., Weiss G.H., Zelen M. Studies of leukocyte kinetics by liquid Scintillation counting in normal individuals and patients with chronic myeloid leukemia. // J. Clinical Investigation. – 1966. – Vol. 45, № 9. – P. 1388–99.
33. Primo D., Flores J., Quijano S. et al. Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia // Brit.J.Haematol. – 2006. – Vol. 135. – P. 43–51.
34. Selleri C., Maciejewski J.P., Pane F. et al. Fas-mediated modulation of bcr/abl in CML results in differential effects on apoptosis //Blood. – 1998. – Vol. 92. – P. 981–9.
35. Stoklosa T., Poplawski T., Koptyra M. et al. Bcr/abl inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68. – P. 2576–80.
36. Strife A., Clarkson B. Biology of CML – is discordant maturation the primary defect? // Sem. Hematology. – 1988. – Vol. 25. – P. 1–19.
37. Strife A., Lambek C., Wisniewski. et al. Discordant maturation as the primary biological defect in CML // Cancer Res. – 1988. – Vol. 48. – P. 1035–41.
38. Traycoff C.V., Haistead B., Rice S. et al. Chronic myelogenous leukaemia CD34⁺cells exit G0/G1 phases of cell cycle more rapidly than normal marrow CD34⁺cells // Brit. J. Haematology. – 1998. – Vol. 102. – P. 759–67.

**Материалы II Всероссийской научной конференции
с международным участием «Наноонкология», Тюмень, 26-28 сентября 2010 г.**

В.А. Галынкин, Н.В. Кожемякина

**ДЕЙСТВИЕ УГЛЕВОДНЫХ ФРАКЦИЙ МИЦЕЛИЯ FOMES FOMENTARIUS
И GANODERMA APPLANATUM
НА РОСТ ПОДКОЖНО ПЕРЕВИТОЙ АСЦИТНОЙ ОПУХОЛИ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ**
Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

Грибные полисахариды обладают иммуностимулирующими и противоопухолевыми свойствами. В настоящее время препараты на основе грибных гликанов не используются в онкологической практике в качестве единственных средств для лечения раковых заболеваний из-за недостаточной эффективности, однако их широко применяют в комплексной терапии раковых больных и в качестве средства поддерживающей терапии.

Существенным достоинством грибных гликанов помимо действия на опухоли является способность значительно снижать побочные эффекты химио- и радиотерапии, а также отсутствие токсичности. В системе противоопухолевой защиты организма важное место занимает иммунный надзор, который реализуется за счет специфического противоопухолевого иммунитета и неспецифической противоопухолевой резистентности. Роль гуморального (антительного) противоопухолевого иммунного ответа невелика, что связано с низкой иммуногенностью опухолевых антигенов. В настоящее время ведущую роль в иммунном распознавании и отторжении злокачественных клеток придают системе неспецифической противоопухолевой резистентности.

Изучено действие углеводных фракций, выделенных из мицелия грибов *Fomes fomentarius* и *Ganoderma applanatum* на рост подкожно перевитой асцитной опухоли Эрлиха. Показано, что растворимая фракция мицелия *G. applanatum* вызвала статистически достоверное торможение роста опухоли и обладала наиболее значительным и продолжительным противоопухолевым эффектом, нерастворимые фракции *F. fomentarius* и *G. applanatum* соответственно оказывали слабое и умеренное противоопухолевое действие.

Установлено, что фракции при внутрибрюшинном введении оказывали стимулирующее действие на функциональную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов, причем более выраженный активирующий эффект на макрофаги оказывала растворимая фракция *G. applanatum*.

Установлено, что полисахаридные фракции, выделенные из мицелия обладают выраженным, стимулирующим действием на клетки системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), что проявляется в увеличении показателей их функциональной активности. Растворимая полисахаридная фракция *G. applanatum* более активна по сравнению с нерастворимыми фракциями.

М.Б. Дюкалова, Б.Г. Некрасов, А.А. Ильичев

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОПУХОЛЬ-НАПРАВЛЕННЫХ ПЕПТИДОВ**
ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»

К принципиальным проблемам химиотерапии онкозаболеваний в настоящее время относятся неизбирательность действия и эмпирический подбор препаратов, частое развитие резистентности. Преодоление данных ограничений стало возможно с момента становления целевой (таргетной) терапии, направленной на повышение избирательного воздействия цитотоксических препаратов на опухолевые клетки.

Целью данной работы был *in vivo* отбор пептидов, связывающихся с опухолью Эрлиха на мышинной модели, с помощью технологии скрининга пептидной фаговой библиотеки и проверка связывания выбранного пептида с другими перевиваемыми опухолями и нормальными тканями мышей.

Главным методом, использованным в данной работе, являлся *in vivo* скрининг пептидной фаговой библиотеки. Работа проводилась на мышах-самцах линий СВА, А/Sn и DBA/2 с соблюдением всех условий работы с лабораторными животными. Для перевивания использовались опухоль Эрлиха, аденокарцинома легких и субштаммы мышинного лейкоза.

В результате исследования был получен пул связывающихся с опухолью Эрлиха фагов, экспонирующих 15-мерные пептиды. Проверка на селективность связывания показала, что спустя 24 часа после введения отобранные фаговые клоны обнаруживались в опухоли в десятки раз большем количестве, чем в нормальных тканях мыши, уровень связывания с которыми не превышал уровня связывания диких фагов (контроля).

Среди девяти фаговых клонов был выбран один, и дальнейшая работа проводилась с ним. Была показана перекрестная реакция данного клона с двумя другими опухолями. Но при его инкубации с клетками асцитной опухоли Эрлиха оказалось, что уровень связывания сопоставим с уровнем связывания контрольного фага. Эти факты позволяют предположить, что отобранный фаговый клон связывается со структурой, локализованной на эндотелии новообразованных сосудов опухоли.

Таким образом, на мышинной модели с использованием технологии фагового дисплея нами были отобраны пептиды, специфически связывающиеся с опухолями (возможно, сосудами). Являясь потенциальными носителями, такие пептиды могут входить в состав конъюгатов с диагностическими или цитотоксическими препаратами, повышая их избирательность взаимодействия с опухолями для диагностики и терапии злокачественных новообразований и метастазов.

УДК 618.19-006.6-033.2-085.28:577.112

Г.П. Генс¹, Н.И. Моисеева², Т.П. Стромская², Е.Ю. Рыбалкина², А.В. Вайман²,
Л.П. Овчинников³, А.А. Ставровская²

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКА YB-1 И ХИМИОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Центральная клиническая больница им. Н.А.Семашко № 2 ОАО «РЖД», Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

³Институт белка РАН, Пушкино, Московская область

Контактная информация:

Моисеева Наталья Ивановна, аспирантка лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза

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

e-mail: nigrin27@mail.ru

Статья поступила: 26.04.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Многофункциональный белок YB-1 обнаруживается как в ядрах опухолевых клеток, так и в цитоплазме. YB-1 принимает участие во многих ДНК- и мРНК-зависимых процессах. Данная работа направлена на выяснение связи между локализацией белка YB-1 в ядрах клеток опухолей молочной железы и химиотерапией РМЖ. Исследованы срезы 78 опухолей. Окраска срезов антителами к YB-1 показала, что использованные в работе антитела достаточно часто, почти в трети случаев, выявляют ядерную локализацию YB-1 (пороговое значение – не менее 10 % клеток с ядерной локализацией YB-1). Число случаев с локализацией YB-1 в ядрах опухолевых клеток не зависит от подтипа РМЖ (подтипы – люминальный А, люминальный В, базальный и HER2/neo⁺). При ядерной локализации YB-1 наблюдается тенденция к более раннему возникновению метастазов РМЖ. Обнаружено, что неоадьювантная терапия РМЖ может приводить к накоплению клеток с ядерной локализацией YB-1. Число случаев с метастазами, возникающими после адьювантной терапии, не зависит от ядерной локализации YB-1. Полученные данные позволяют предполагать, что резистентность больных РМЖ к химиотерапии может быть связана с экспрессией YB-1 в цитоплазме опухолевых клеток: экспрессия YB-1 в цитоплазме опухолевых клеток коррелирует с повышенным количеством мРНК нескольких генов, определяющих множественную лекарственную устойчивость.

Ключевые слова: рак молочной железы, белок YB-1, метастазирование, множественная лекарственная устойчивость, адьювантная и неоадьювантная химиотерапия.

G.P. Gens¹, N.I. Moiseeva², T.P. Stromskaya², E.Yu. Rybalkina², A.V. Vaiman²,
L.P. Ovchinnikov³, A.A. Stavrovskaya²

INTRACELLULAR LOCALIZATION OF YB-1 AND CHEMOTHERAPY OF BREAST CANCER

¹N.A. Semashko Central Clinical Hospital №2, Moscow

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

³Institute of protein research of RAS, Puschino, Moscow Region

Abstract

Multifunctional protein YB-1 is found both in nuclei of tumor cells and in cytoplasm. It participates in various DNA- and RNA-dependent processes. The aim of this study is to reveal the connections between YB-1 nuclear localization and chemotherapy of breast cancer. There were 78 patients with BC studied. Staining of the BC tumor tissues slides with YB-1 antibodies showed that YB-1 is localized in cell nuclei in one third of the tumors (threshold – more than 10 % of the cells with YB-1 in the nuclei). The number of cases with YB-1 nuclear localization did not depend on BC type (luminal A, luminal B, basal and HER2/neo⁺). The trend to earlier occurrence of metastasis was revealed in the cases with YB-1 nuclear localization. The neo-adjuvant therapy of BC resulted in the increase of the number of cases with YB-1 nuclear localization. The number of BC cases with metastasis arising after adjuvant chemotherapy did not depend on the YB-1 nuclear localization in the dissected tumor. Our data suggest that resistance of BC to chemotherapy could be linked with YB-1 cytoplasmic localization. We have also observed that the expression of YB-1 in the cytoplasm of tumor cells correlated with increased level of several multidrug resistance mRNA.

Key words: breast cancer, protein YB-1, metastasis, multidrug resistance, neoadjuvant and adjuvant chemotherapy.

Введение

Цель данной работы – выяснить, связан ли характер внутриклеточной локализации белка YB-1 в опухолях молочной железы с неоадьювантной химиотерапией, и насколько связаны локализация YB-1 в ядрах опухолевых клеток и результативность адьювантной химиотерапии.

Многофункциональный белок YB-1 является членом семейства ДНК- и РНК-связывающих белков

с эволюционно консервативным доменом холодового шока. YB-1 принимает участие во многих ДНК- и мРНК-зависимых процессах [5; 19; 22]. Этот белок обнаруживается как в ядре, так и в цитоплазме клеток млекопитающих. Функционируя в качестве фактора транскрипции в ядре, YB-1 регулирует в клетке экспрессию генов, содержащих Y-боксы в промоторах, в том числе генов МЛУ *MDR1* и *LRP* и генов циклинов, участвуя, таким образом, в регуляции МЛУ и размножения клеток [5; 19].

В цитоплазме YB-1 является одним из основных белков, связывающихся с мРНК и формирующих мРНКП (рибонуклеопротеиновые частицы) с уникальными физико-химическими характеристиками. От его количества в мРНКП зависит скорость синтеза различных белков. Связываясь с актином [23] и тубулином [8; 9], белок YB-1 может участвовать в локализации мРНКП на актиновых микрофиламентах и их транспорте по микротрубочкам.

Таким образом, с локализацией YB-1 в клетках связаны разные молекулярные механизмы, определяющие его влияние на фенотип опухолевых клеток.

Важная роль YB-1 в эволюции злокачественных новообразований в настоящее время не подвергается сомнению. YB-1 участвует в регуляции размножения опухолевых клеток, в их метастазировании и лекарственной устойчивости [5; 11; 12; 18; 19; 22], однако многие вопросы остаются не ясными. В частности, не ясно, с какими активностями этого многофункционального белка связаны его отдельные эффекты.

В различных злокачественных опухолях (молочной железы, легкого, яичников, остеосаркомах и некоторых других) может быть повышено количество клеток, в которых YB-1 локализован в ядрах (по сравнению с нормальными тканями). Было найдено, что такое повышение коррелирует с резистентностью опухолей к химиотерапии и с неблагоприятным течением заболевания [6; 15; 17; 18; 19; 22]. Локализацию YB-1 в ядрах малигнизированных клеток было предложено рассматривать в качестве маркера МЛУ злокачественных новообразований [21]. Однако, несмотря на достаточно многочисленные исследования, ядерная локализация YB-1 пока не стала принятым маркером МЛУ опухолей.

Это можно объяснить следующим:

Во-первых, оказалось, что случаев, в которых YB-1 обнаруживался в ядрах клеток, в некоторых выборках находили немного, поэтому не всегда можно было достоверно оценить искомые корреляции.

Во-вторых, появились исследования, в которых не подтверждалась прогностическая значимость ядерной локализации YB-1 при РМЖ [20].

Для исследования роли внутриклеточной локализации YB-1 в чувствительности больных РМЖ к химиотерапии в данной работе мы использовали антитела к YB-1, которые достаточно часто выявляют ядерную локализацию этого белка в опухолях молочной железы.

Мы применили ранее отработанный нами метод оценки характера локализации YB-1 в клетках, показывающий действительно ли YB-1 локализован в ядрах клеток [1], и оценили количество клеток с локализацией YB-1 в ядре в срезах опухолей молочной железы. Образцы взяты при операции. Исследовали ткани больных, получавших и не получавших неоадьювантную и/или адьювантную терапию.

Материалы и методы

Больные

В исследование включены 78 больных РМЖ I–III стадии (табл. 1).

Гистологические варианты опухолей:

- инфильтративный протоковый рак – 71 случай,
- медулярный рак – 3 случая,
- дольковый рак – 1 случай,
- слизистый рак – 1 случай.

Время наблюдения за пациентками –17÷50 мес. (в среднем 34,5 мес.).

Иммуногистохимические исследования

Определение локализации YB-1 в образцах опухолей проводили по методике, описанной ранее [1; 2]. Гистологические препараты опухолевой ткани, полученные от больных во время операции, готовили по общепринятой методике, затем их депарафинизировали обработкой ксилоловым и этиловым спиртами. Депарафинизированные препараты материала от больных инкубировали с крысиными поликлональными антителами к YB-1 (АТ к YB-1, любезно предоставленные С.П. Домогатским, были получены путем иммунизации крыс синтетическим пептидом, который соответствовал 15 С-концевым аминокислотным остаткам YB-1 «AENSSAPEAEQGGAE»). Затем клетки инкубировали со вторыми АТ к IgG крысы, меченными TRITC (Rhodamine; Sigma). Подсчет числа клеток с цитоплазматической и ядерной локализацией YB-1 проводили с помощью флуоресцентного микроскопа (Carl Zeiss, Германия). Для уточнения внутриядерной локализации YB-1 те же препараты окрашивали Хехст 33258 (Sigma) сопоставляли окраску клеток АТ к YB-1 и Хехст 33258 [1].

За положительную ядерную локализацию YB-1 принимали те случаи, в которых АТ окрашивали ядра не менее чем в 10 % клеток. Анализировали не менее 200 клеток в каждом препарате. Определение экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов и прогестерона) проводили общепринятым методом (ИГХ).

Лечение

Неoadьювантная ХТ в большинстве случаев проводилась по схеме FAC (5–ФУ – 500 мг/м², доксорубин – 50 мг/м², циклофосфан – 500 мг/м²) каждый 21 день. Полный лечебный патоморфоз был достигнут в 12,5 % случаев, что соответствует данным мировой литературы [4; 13]. В случае полного лекарственного патоморфоза адьювантная ХТ проводилась по той же схеме. При неполном лекарственном патоморфозе (I степень) в схему адьювантной ХТ включали таксаны. Адьювантная ХТ в большинстве случаев в нашем исследовании проводилась по схеме FAC/AC (доксорубин 60 мг/м², циклофосфан 600 мг/м²) каждый 21 день. Об эффективности терапии судили по двум показателям: появлению отдаленных метастазов и кривым БРВ.

Определение количества мРНК генов МЛУ

Проводили с помощью метода полуколичественной ОТ-ПЦР. Детали методики и использованные праймеры описаны ранее [2]. Выделение тотальной РНК осуществляли при помощи TRI Reagent (Sigma, USA) в соответствии с протоколом производителя. Генами «домашнего хозяйства» служили β-актин и GAPDH. Использовали следующие специфические праймеры:

актин (540 пн)
GTGGGGCGCCCCAGGCACCA (прямой);
CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC (обратный);
GAPDH (513 пн)
CCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTT (прямой);
GGCCATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA (обратный);
YB-1 (476 пн)
ACAAGAAGGTCATCGCAACGAAG (прямой);
GGTTGGAATACTGTGGTCGACG (обратный);
MDR1 (167 пн)
CCCATCATTTGCAATAGCAGG (прямой);
GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA (обратный);
MRP1 (180 пн)
ATCAAGACCGCTGTCTATTGG (прямой);
GAGCAAGGATGACTTGCAGG (обратный);
LRP (405 пн)
CCCCCATACCACTATATCCATGTG (прямой);
TCGAAAAGCCACTGATCTCCTG (обратный).

Таблица 1

Больные, включенные в исследование

Особенность случая		Всего исследовано
Возраст	До 50 лет	22
	После 50 лет	56
Размер опухоли	До 5 см (T ₁ –T ₂)	54
	Более 5 см (T ₃ –T ₄)	24
Патологоанатомический диагноз:	Инфильтративный протоковый рак	73
	Медуллярный рак	3
	Дольковый рак	1
	Слизистый рак	1
Метастазы в регионарные лимфоузлы	N ₀	36
	N ₁₋₃	42
Рецепторы эстрогенов (РЭ)	РЭ ⁺	20
	РЭ ⁺	45
Рецепторы прогестерона (РП)	РП ⁺	36
	РП ⁺	29
HER2/neo	HER2/neo ⁺	31
	HER2/neo ⁺	17
Химиотерапия	Неoadьювантная	17
	Адьювантная	36

Таблица 2

Степень экспрессии мРНК генов МЛЮ в опухолях молочной железы (T₁–T₂)

Степень экспрессии	Содержание мРНК генов МЛЮ			
	MDR1	MRP1	BCRP	LRP
– или +/-	16	13	11	9
+	2	2	4	6
++ или +++	4	5	2	1
Всего исследовано случаев	22	20	17	16
Всего случаев с повышенным содержанием мРНК генов МЛЮ	6	7	6	7

Таблица 3

Больные, у которых обнаружена повышенная экспрессия нескольких генов МЛЮ

Случай №	Гены МЛЮ			
	MDR1	MRP1	BCRP	LRP
1	++	++	но	+
2	++	++	но	+
3	–	+	–	+
4	–	+	–	+
5	–	–	+	+
6	+	++	–	но
7	++	++	++	но

Условия амплификации: 30 сек при 94 °С, затем 25–40 циклов: 10 сек при 94 °С, 10 сек при 60 °С, 10 сек при 72 °С, затем 1 мин при 72 °С. Продукты амплификации в объеме 20 мкл реакционной смеси разделяли электрофорезом в 2 %-ном агарозном геле с бромистым этидием. Гель фотографировали при помощи цифровой видеокамеры.

Статистическая обработка

Использовались статистические методы χ^2 , точный односторонний метод Фишера, критерий Каплан-Майер. Различия в группах считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Обработка данных производилась с помощью программы GraphPadPrism 5.1.

Результаты

Типы РМЖ, исследованные в работе

Хорошо известно, что РМЖ – гетерогенное заболевание. Используя общепринятые иммуногистохимические маркеры РМЖ (экспрессию рецепторов эстрогенов и прогестеронов), а также экспрессию рецептора HER2/neu, мы подразделили

исследованные опухоли молочной железы на следующие подтипы:

1. ER⁺ и/или PR⁺, HER2[–] (далее – ER⁺/HER2[–])
2. ER⁺ и/или PR⁺, HER2⁺ (далее – ER⁺/HER2⁺)
3. ER[–], PR[–], HER2[–] (далее – ER[–]/HER2[–])
4. ER[–] и/или PR[–]/HER2⁺ (далее – ER[–]/HER2⁺)

Рис. 1 А показывает, что данные подтипы РМЖ встречались среди исследованных нами опухолей с разной частотой.

Эти подтипы отличались друг от друга по доле случаев, с прогрессированием заболевания – по частоте возникновения отдаленных метастазов (в сроки от 4 мес. до 48 мес.; средний срок возникновения метастазов 18 мес.).

Наиболее благоприятное течение заболевания наблюдалось у больных, отнесенных нами к группе ER⁺ и/или PR⁺, HER2[–] (частота прогрессирования 10,5 %).

Больше отдаленных метастазов и рецидивов возникало у больных, относящихся к другим группам: ER⁺ и/или PR⁺, HER2⁺ (33 %), ER[–], PR[–], HER2[–] (27 %).

В группе ER[–]/HER2⁺ метастазы возникли у 2 из 5 пациентов.

Частота встречаемости клеток с ядерной локализацией YB-1

Исследование срезов всех 78 опухолей (операционный материал) показало, что антитела к YB-1 почти в 12 % случаев не окрашивают срезы опухолевой ткани, в большинстве случаев (60 %) антитела к YB-1 окрашивают только цитоплазму и почти в 30 % случаев окрашивают ядра клеток (рис. 1 Б).

Ясно, что таким образом нам удастся выявить достаточно значимое количество случаев с локализацией YB-1 в ядрах опухолевых клеток. На рис. 2 приведены примеры окрашивания срезов опухолей антителами к YB-1 (цитоплазматическая и ядерная локализация этого белка).

Сравнение частоты встречаемости клеток с ядерной локализацией YB-1 в зависимости от подтипов РМЖ показывает, что статистически значимой корреляции частоты обнаружения клеток с ядерной локализацией YB-1 и подтипа опухоли нет. Доля клеток с ядерной локализацией YB-1 варьировала в пределах от 21 до 40%.

Связь внутриклеточной локализации YB-1 и прогрессии РМЖ

За время наблюдения (от 17 до 50 мес.) у 17 больных (21,8 %) было выявлено прогрессирование заболевания (отдаленные метастазы или рецидивы). В группе больных с цитоплазматической локализацией YB-1 прогрессирование возникло в 24 % случаев, а в группе больных с ядерной локализацией YB-1 в 30 % ($p=0,6$). Т.е. статистически значимых различий между двумя сравниваемыми группами по частоте прогрессирования заболевания нет. Стоит отметить, что ни у одной пациентки из десяти, у которых YB-1 не был детектирован, прогрессирование заболевания не наблюдалось. Сравнение времени появления метастазов у больных в зависимости от характера внутриклеточной локализации YB-1 показывает, что у пациенток с ядерной локализацией YB-1 метастазы появляются в более ранние сроки. Поскольку время наблюдения пока невелико, эти различия статистически не значимы ($p=0,3$), но тенденция просматривается (рис. 3). Таким образом, при ядерной локализации YB-1 наблюдается тенденция к более раннему прогрессированию РМЖ.

Влияние неоадъювантной терапии на внутриклеточную локализацию YB-1

Важнейшими параметрами, используемыми для характеристики РМЖ, остаются диаметр опухоли в сантиметрах и наличие поражения метастазами подмышечных лимфоузлов метастазами.

Сравнение частоты встречаемости клеток с ядерной локализацией YB-1 в зависимости от размеров опухолей у пациенток, которые не получали неоадъювантную терапию, показало, что нелеченные опухоли малых (T_1-T_2 – до 5 см) и больших размеров (T_3-T_4 – более 5 см) не различаются по частоте встречаемости клеток с ядерной локализацией YB-1. Если среди малых опухолей около 20 % характеризовалось ядерной локализацией YB-1, то среди больших опухолей около 18 % имели клетки с YB-1 в ядре (рис. 4).

Анализ показывает, что с влиянием неоадъювантной терапии может быть связана транслокация YB-1 из цитоплазмы в ядро как в малых, так и в больших опухолях. Среди больных, получавших неоадъювантную терапию, доля случаев с ядерной локализацией YB-1 была выше. В группе пациенток с размерами опухолей T_1-T_2 доля случаев с

ядерной локализацией YB-1 увеличена. В группе пациенток, получавших неоадъювантную терапию, и с размерами опухолей T_3-T_4 доля случаев с ядерной локализацией составила 63 %, без терапии эта доля была 18 % (см. рис. 4).

Постоперационная терапия и внутриклеточная локализация YB-1

Целью данной части работы было получить ответ на вопрос, связана ли чувствительность больных к адъювантной (постоперационной) терапии с характером локализации YB-1 в клетках ранее удаленной опухоли. В данную группу больных включены и пациентки, получавшие неоадъювантную терапию. Из данных, приведенных на рис. 5, видно, что доля случаев с прогрессированием практически одинакова в группах опухолей с цитоплазматической (38,9 %) и с ядерной локализацией (41,7 %).

Важно заметить, что в группе «YB-1 не детектируется» не было ни одного случая с прогрессированием заболевания. Нужно заметить также, что доля случаев с рецидивами и метастазами среди пациенток, получавших адъювантную терапию, велика – около 40 % (при сроках наблюдения от 17 до 50 мес.). Это свидетельствует в пользу того, что применявшаяся терапия недостаточно эффективна, и часть опухолей могла быть резистентной к химиотерапии. По-видимому, одной из причин этого может быть размножение опухолевых клеток, которые устойчивы к лечению.

Количество мРНК генов МЛУ в опухолях малых размеров

С целью проверки этого предположения мы исследовали опухоли малых размеров с помощью полуквантитативного метода ОТ-ПЦР (табл. 2). Все эти больные не получали неоадъювантную терапию, т.е. влияние неоадъювантной терапии на внутриклеточную локализацию YB-1 исключается. Мы нашли, что в некоторых малых опухолях (T_1-T_2), не подвергавшихся терапии, наблюдается повышенная экспрессия мРНК генов МЛУ. Исследован материал от 22 больных (см. табл. 2). Существенно, что почти все эти опухоли характеризуются цитоплазматической локализацией YB-1. Между тем, в этих случаях достаточно часто (примерно в 30 %) наблюдалось повышенное количество мРНК нескольких разных генов МЛУ. В разных опухолях (у разных больных) обнаружено повышение количества мРНК разных генов МЛУ, в нескольких случаях наблюдалось повышенное содержание мРНК одновременно 2–3 генов МЛУ (7 случаев, все с цитоплазматической локализацией YB-1; табл. 3, рис. 6).

Таким образом, опухоли малых размеров, у больных, не подвергавшихся химиотерапии, нередко характеризуются повышенным количеством мРНК сразу нескольких генов МЛУ. При этом белок YB-1 в этих опухолях чаще всего имеет цитоплазматическую локализацию.

Обсуждение

В данной работе мы исследовали связь проведенной химиотерапии больных РМЖ и характера внутриклеточной локализации многофункционального белка YB-1. Прежде всего, мы разделили исследуемые опухоли на биологические подтипы, используя классические маркеры (рецепторы половых гормонов и белок HER2, определяемые иммуногистохимическим методом – 1) ER+ и/или PR+, HER2–; 2) ER+ и/или PR+, HER2+; 3) ER–, PR–, HER2–; 4) HER2+/ER– PR–.

Согласно сопоставлению результатов иммуногистохимических исследований с результатами применения экспрессионных микрочипов, эти 4 подтипа можно условно обозначить как: 1) люминальный А; 2) люминальный Б; 3) базальный; 4) HER2-положительный [7; 10; 16]. Мы нашли, что данные подтипы РМЖ встречались среди исследованных нами опухолей с разной частотой. Эти подтипы отличались друг от друга по доле случаев с прогрессией – т.е. по частоте возникновения отдаленных метастазов. Наиболее прогностически благоприятным оказался подтип ER+ и/или PR+, HER2– (люминальный А), наименее благоприятным подтип HER2+/ER– PR–, что совпадает с принятыми в настоящее время представлениями и свидетельствует о том, что выделенные нами подтипы РМЖ соответствуют общепринятым. Сравнение частоты встречаемости клеток с локализацией YB-1 в ядрах в зависимости от подтипов РМЖ показало, что статистически значимой корреляции частоты клеток с ядерной локализацией YB-1 и подтипа опухоли нет. Эти данные свидетельствуют о том, что ядерная локализация YB-1 не является характерным признаком какого-то одного подтипа РМЖ. Поскольку нами исследованы опухоли, взятые при операции, мы не можем судить о влиянии ядерной локализации YB-1 на эффективность неоадьювантной терапии. Недавно появилась работа, в которой был исследован материал 116 трепанобиопсий опухолей молочной железы и показано, что классификация РМЖ, основанная на экспрессии рецепторов половых гормонов и HER2 дает возможность предсказать ответ больных РМЖ на неоадьювантную терапию и обладает независимой прогностической ценностью: в опухолях, характеризовавшихся ко-экспрессией рецепторов гормонов и HER2 чаще отмечали полный лекарственный патоморфоз и благоприятный прогноз, в то время как новообразования с фенотипом HR-/HER- and HR-/HER+ имели худший клинический прогноз, особенно в тех случаях, когда полный патоморфологический ответ не был достигнут [10]. В этом исследовании YB-1 (цитоплазматическая локализация) был обнаружен в 33% опухолей. Экспрессия YB-1 в опухолях неблагоприятных групп не сказывалась на ответе пациентов на неоадьювантную терапию [10]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что хотя ответ больных РМЖ на неоадьювантную терапию зависит от принадлежности опухолей к определенным подтипам РМЖ, этот ответ не зависит от экспрессии YB-1 (в данной работе – от экспрессии этого белка в цитоплазме). Однако пока речь идет всего об одной работе.

Если влияние YB-1 на ответ больных РМЖ на неоадьювантную терапию пока недостаточно исследовано, наши данные и результаты предыдущих исследований позволяют утверждать, что неоадьювантная терапия сказывается на числе случаев с ядерной локализацией YB-1 в популяциях опухолевых клеток у больных. В данном исследовании мы показали, что с неоадьювантной терапией может быть связана транслокацией YB-1 из цитоплазмы в ядро как в малых, так и в больших опухолях. Таким образом, с неоадьювантной терапией может быть связано повышение числа случаев, в которых белок YB-1 может функционировать в качестве фактора транскрипции. Ранее было показано, что лечение 27 больных РМЖ таксолом примерно в одной трети случаев привело к перемещению YB-1 в ядра опухолевых клеток, это сопровождалось повышением экспрессии Р-гликопротеина [14]. Это свидетельствует в пользу того, что неоадьювантная терапия может способствовать повышению активности ABC транспортеров в опухолях, в частности, тех белков, чья экспрессия регулируется YB-1. Часть случаев с рецидивами может быть связана с влиянием неоадьювантной

терапии на внутриклеточную локализацию YB-1, т.е. с увеличением числа клеток с ядерной локализацией YB-1. Сравнение времени появления метастазов и рецидивов у больных в зависимости от характера внутриклеточной локализации YB-1 показывает, что наблюдается тенденция к более раннему появлению метастазов у пациенток с ядерной локализацией YB-1. Целый ряд экспериментальных и клинических данных позволяет связывать ядерную локализацию YB-1 и резистентность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам [3; 6; 17; 21; 22].

Наши данные позволяют полагать, что наряду с активностью YB-1 в качестве фактора транскрипции (при его ядерной локализации) существенную роль в устойчивости РМЖ к химиотерапевтическим препаратам может играть и активность этого белка в цитоплазме. Во-первых, в группе больных, получавших адьювантную терапию, у значительной части пациенток с малыми опухолями обнаружена цитоплазматическая локализация YB-1. Это может означать, что в части случаев с прогрессированием эволюция РМЖ может быть связана с активностью YB-1 в цитоплазме. Во-вторых, исследование количества мРНК генов МЛЮ в 22 опухолях малых размеров показало, что примерно в 30 % случаев нелеченных новообразований в них обнаруживается повышенное количество мРНК нескольких разных генов МЛЮ. Таким образом, опухоли малых размеров, не подвергавшиеся химиотерапии, нередко характеризуются повышенным количеством мРНК сразу нескольких генов МЛЮ. При этом белок YB-1 в этих опухолях чаще всего локализован в цитоплазме. Таким образом, ядерная локализация YB-1 не является необходимым условием для возникновения МЛЮ, связанной с активностью ABC транспортеров. В процессе активации ABC транспортеров при РМЖ YB-1 может участвовать и в качестве цитоплазматического фактора.

Заключение

Работа направлена на выяснение связи локализации белка YB-1 в ядрах клеток опухолей молочной железы и ответа больных РМЖ на химиотерапию. Окраска срезов опухолей антителами к YB-1 показала, что использованные в работе антитела достаточно часто выявляют ядерную локализацию YB-1 – почти в трети случаев (порог – более 10 % клеток с ядерной локализацией YB-1). Число случаев с локализацией YB-1 в ядрах опухолевых клеток не зависит от подтипа РМЖ. При ядерной локализации YB-1 наблюдается тенденция к более раннему возникновению метастазов и рецидивов РМЖ. Обнаружено, что с неоадьювантной терапией РМЖ может быть связано перемещение YB-1 в ядра опухолевых клеток. Число случаев с метастазами и рецидивами, возникающими после адьювантной (постоперационной) терапии, не зависит от ядерной локализации YB-1 в тканях удаленных опухолей. Нами найдено, что гиперэкспрессия YB-1 в цитоплазме опухолевых клеток ассоциирована с повышенным количеством мРНК нескольких генов, определяющих МЛЮ, в частности с повышенным количеством мРНК транспортеров семейства ABC и белка LRP/MVP. Полученные данные позволяют полагать, что резистентность больных РМЖ к адьювантной терапии может быть связана с тем, что YB-1 гиперэкспрессирован в цитоплазме опухолевых клеток.

Работа выполнена при поддержке фонда «Вольное дело», Грантов Российского фонда фундаментальных исследований 07-04-00720, 08-04-00251-а, Программы президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

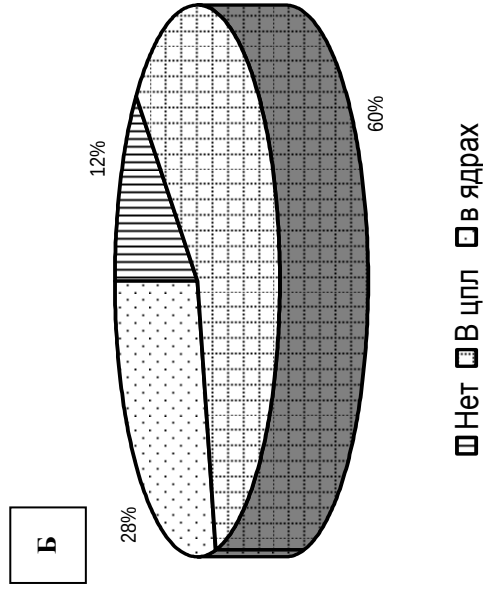
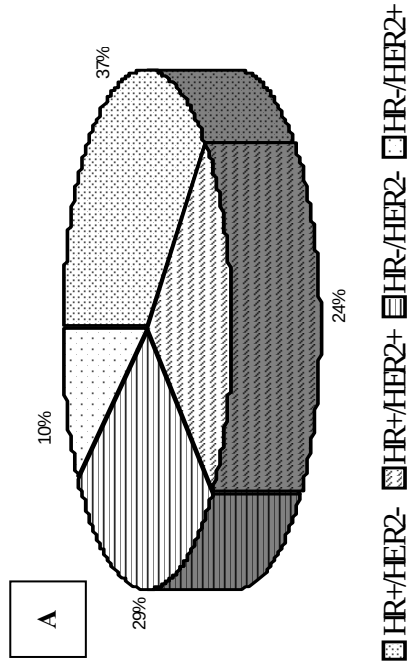


Рис. 1. Распределение исследованных опухолей по типам РМЖ и внутриклеточной локализации УВ-1:
 А – частота встречаемости разных типов РМЖ среди исследованных опухолей;
 Б – частота встречаемости РМЖ с разными типами внутриклеточной локализации белка УВ-1.

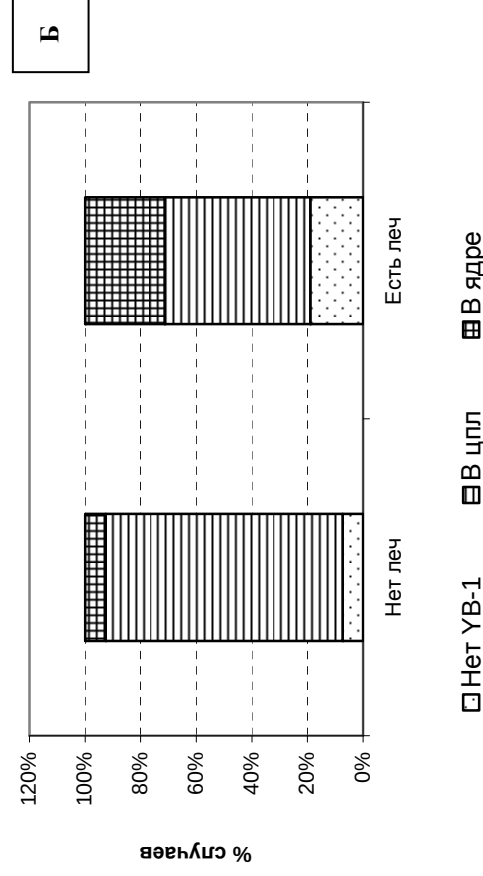
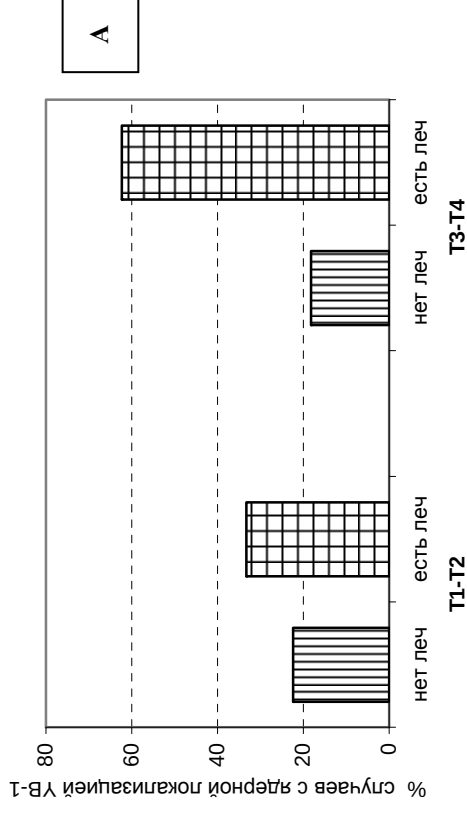


Рис. 2. Внутриклеточная локализация белка УВ-1. Окраска срезов опухолей антителами к УВ-1. Увеличение $\times 400$.
 А – Опухоль большой А. Цитоплазматическая локализация УВ-1.
 Б – Опухоль большой К. В большинстве клеток УВ-1 локализован в ядре.

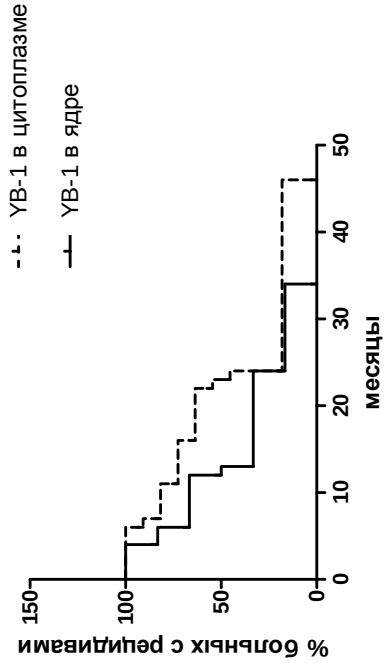


Рис. 3. Время появления метастазов и рецидивов у больных с цитоплазматической и ядерной локализацией белка YB-1 в опухолевой ткани.

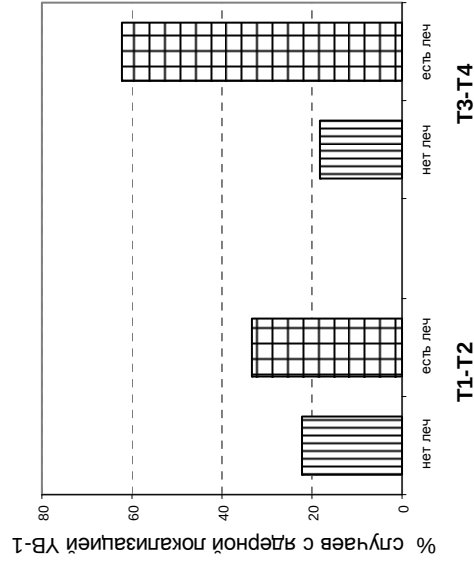


Рис. 4. Связь неoadъювантной терапии РМЖ и внутриклеточной локализации белка YB-1 в опухолевой ткани.

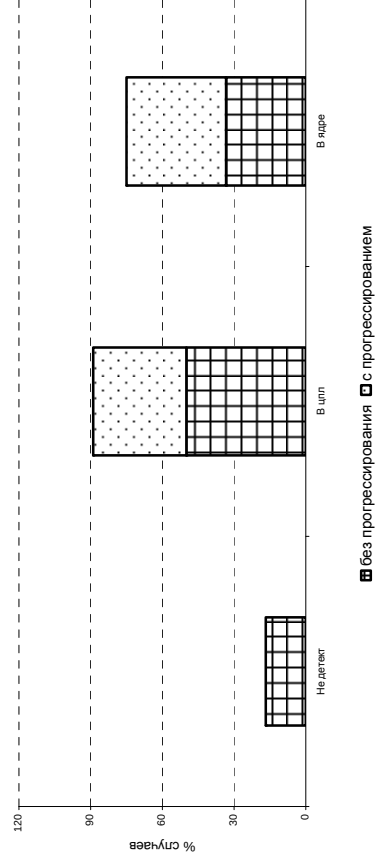


Рис. 5. Внутриклеточная локализация YB-1 в тканях удаленных опухолей молочной железы и прогрессирование заболевания.

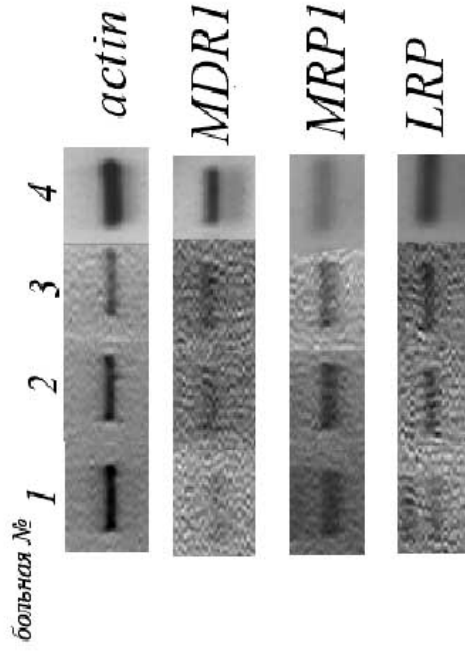


Рис. 6. Количество мРНК генов МЛУ в опухолях больных РМЖ. Полуколичественная ОТ-ПЦР.

Литература

1. Вайман А.В., Генс Г.П., Стромская Т.П. и др. Исследование роли белка YB-1 в лекарственной устойчивости опухолей молочной железы // Мол. мед. – 2007. – № 1. – С. 31–7.
2. Вайман А.В., Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю. и соавт. Содержание и локализация белка YB-1 в опухолевых клетках с множественной лекарственной устойчивостью // Биохимия. – 2006. – Т. 71, №2. – С. 190–200.
3. Вайман А.В., Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю. и др. Возникновение лекарственной устойчивости в популяции клеток опухоли кишечника под влиянием многофункционального белка YB-1 // БЭБиМ. – 2007. – Т. 143, № 4. – С. 442–5.
4. Семглазов В.Ф., Арзуманов А.С., Божок А.А. и др. Новый взгляд на неоадьювантную химиотерапию рака молочной железы (роль нафелбина) // Современная онкология. – 2003. – Том 5, №3.
5. Скабкин М.А., Скабкина О.В., Овчинников Л.П. Мультифункциональные белки с доменом холодового шока в регуляции экспрессии генов // Успехи биол. химии. – 2004. – 44. – С. 3–52.
6. Bargou R.C., Jurchott K., Wagener C. et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression // Nat. Med. – 1997. – 3. – P. 447–50.
7. Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study // JAMA. – 2006. – 295(21). – P. 2492–502.
8. Chernov K.G., Curmi P.A., Hamon L. et al. Atomic force microscopy reveals binding of mRNA to microtubules mediated by two major mRNP proteins YB-1 and PABP // FEBS Letters. – 2008. – 582. – P. 2875–81.
9. Chernov K.G., Mechula A., Popova N.V. et al. YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules // BMC Biochem. – 2008. – 9(23). – P. 1–16.
10. Darb-Esfahani S., Loibl S., Müller B.M. et al. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy // Breast Cancer Res. – 2009. – 11(5). – R69.
11. Evdokimova V., Tognon C., Ng T. et al. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition // Cancer Cell. – 2009 – 15(5). – P. 402–15.
12. Evdokimova V., Tognon C., Ng T., Sorensen P.H. Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1 // Cell Cycle. – 2009. – 8(18). – P. 2901–6.
13. Fisher B., Bryant J., Wolmark N. et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer // J Clin Oncol. – 1998. – 16. – P. 2672–85.
14. Fujita T., Ito K., Izumi H. et al. Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel // Clin. Cancer Res. – 2005. – 11(24 Pt 1). – P. 8837–44.
15. Gessner C., Woischwill C., Schumacher A. et al. Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer // Eur. Respir. J. – 2004. – 23. – P. 14–9.
16. Habibi G., Leung S., Law J.H. et al. Redefining prognostic factors for breast cancer: YB-1 is a stronger predictor of relapse and disease-specific survival than estrogen receptor or HER-2 across all tumor subtypes // Breast Cancer Res. – 2008. – 10(5). – R86.
17. Huang J., Tan P.H., Li K.B. et al. Y-box binding protein, YB-1, as a marker of tumor aggressiveness and response to adjuvant chemotherapy in breast cancer // Int. J. Oncol. – 2005. – 26. – P. 607–13.
18. Janz M., Harbeck N., Dettmar P. et al. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1 // Int. J. Cancer. – 2002. – 97(3). – P. 278–82.
19. Kohno K., Izumi H., Uchiumi T. et al. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1 // Bioessays. – 2003. – 25. – P. 691–8.
20. Kurucz R., Belian E., Treue D., Lage H. Regulation of mRNA expression in drug-sensitive and drug-resistant gastric carcinoma cells is independent of YB-1 expression // Anticancer Res. – 2010. – 30(2). – P. 693–8.
21. Kuwano M., Oda Y., Izumi H. et al. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance // Mol. Cancer Ther. – 2004. – 3. – P. 1485–92.
22. Matsumoto K., Bay B. Significance of the Y-box proteins in human cancers // J. Molec. Genetic Medicine. – 2005. – 1. – P. 11–7.
23. Ruzanov P.V., Evdokimova V.M., Korneeva N.L. et al. Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments // J. Cell Sci. – 1999. – 112, №20. – P. 3487–96.

УДК 618.19-006.6:577.216.32

Е.С. Герштейн, А.М. Щербаков, А.М. Платова, Г.Ю. Чемерис, А.А. Тулеуова, З.К. Карабекова, И.В. Терешкина, Л.К. Овчинникова, М.В. Грицкевич, В.П. Летагин

**СОДЕРЖАНИЕ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ
ЯДЕРНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB
В ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Герштейн Елена Сергеевна, лаборатория клинической биохимии

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-11-59; **факс** +7(495)324-63-52;

e-mail: esgershtein@gmail.com

Статья поступила: 01.09.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Количественными иммуноферментными методами определены содержание и ДНК-связывающая активность p65 субъединицы ядерного транскрипционного фактора NF-κB в опухолях и гистологически неизмененных тканях 119 больных раком молочной железы. В 97% опухолей выявлено усиление ДНК-связывающей активности NF-κBp65 по сравнению с окружающей тканью, в большинстве случаев сопровождавшееся увеличением количества общего белка. Достоверной взаимосвязи со стадией заболевания, размером и гистологическим строением опухоли, степенью поражения лимфатических узлов не обнаружено, но содержание NF-κBp65 в опухолях III степени злокачественности было достоверно выше, чем в опухолях II степени злокачественности. В HER2⁺ опухолях отмечено увеличение общей экспрессии белка NF-κBp65, не зависящее от статуса рецепторов стероидных гормонов и не сопровождающееся увеличением ДНК-связывающей активности, которая наиболее высока в опухолях с «тройным отрицательным» (PЭ⁻PP⁻HER2⁻) рецепторным статусом.

Ключевые слова: ядерный транскрипционный фактор NF-κB, NF-κBp65, рецепторы стероидных гормонов, HER2/neu, рак молочной железы.

E.S. Gershtein, A.M. Scherbakov, A.M. Platova, G.Yu. Tchemeris, A.A. Tuleuova, Z.K. Karabekova, I.V. Tereshkina, L.K. Ovchinnikova, M.V. Gritskevich, V.P. Letyagin

**CONTENT AND DNA-BINDING ACTIVITY
OF NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR NF-κB
IN THE TUMORS OF BREAST CANCER PATIENTS**

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

Abstract

Concentration and DNA-binding activity of nuclear transcription factor NF-κB p65 subunit were measured by quantitative immunoenzymatic methods in the tumors and histologically unchanged mammary gland tissues of 119 breast cancer patients. Enhanced as compared to adjacent tissue NF-κBp65 DNA-binding activity was revealed in 97% of the tumors, and in most cases it was associated with an increase of total NF-κBp65 content. No significant associations were found between the parameters studied and disease stage, tumor size and histology, lymph node status, but NF-κBp65 content was significantly increased in grade III as compared to grade II tumors. HER2⁺ tumors were characterized by an increase of total NF-κBp65 expression independent on steroid receptor status and not accompanied by enhancement of DNA-binding activity, the latter being the highest in “triple receptor negative” (ER⁻PR⁻HER2⁻) tumors.

Key words: nuclear transcription factor NF-κB, NF-κBp65, steroid hormone receptors, HER2/neu, breast cancer.

Введение

Ядерный транскрипционный фактор NF-κB (NF-κB), первоначально идентифицированный как белок, связывающийся со специфической декамерной последовательностью ДНК (GGG ACT TTC C) в интроне гена легких цепей иммуноглобулинов каппа в зрелых В-лимфоцитах и плазматических клетках, играет важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе, воспалительной и аутоиммунной реакциях, поскольку он регулирует экспрессию генов, вовлеченных в эти процессы [6]. NF-κB представляет собой гетеродимерный комплекс белков семейства Rel, которые в большинстве покоящихся клеток неактивны и находятся в цитоплазме в комплексе со специфическими ингибиторами – IκB. Идентифицировано пять белков семейства NF-κB, содержащих общий ДНК-связывающий домен: NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (NF-κB p65), RelB, и c-Rel. Основной

формой существования этих белков в большинстве типов клеток является гетеродимер p50/RelA(p65). ДНК-связывающая активность NF-κB стимулируется в ответ на целый ряд экзогенных стимулов, причем этот процесс не зависит от синтеза белка *de novo*.

В большинстве нормальных клеток NF-κB/IκB комплексы находятся в цитоплазме в транскрипционно неактивном состоянии и активируются только при поступлении в клетку соответствующего регуляторного стимула.

Регуляция NF-κB сигнального пути нарушена во многих опухолях человека, в том числе и при раке молочной железы (РМЖ), при этом в большинстве опухолевых клеток NF-κB постоянно активирован и находится в ядре [1; 4]. Особенно велико значение NF-κB в опухолях молочной железы, отрицательных по рецепторам эстрогенов (PЭ), но имеющих рецепторы эпидермального фактора роста или HER2/neu [5].

Установлено, что гиперактивация NF-κB является одной из причин резистентности РМЖ к антиэстрогенам, химиопрепаратам и лучевой терапии [2-3; 8; 10; 13]. По некоторым данным, оценка степени активации NF-κB в РЭ-положительном РМЖ позволяет выделить подгруппу гормонорезистентных больных [14-15]. Другим клинически значимым эффектом NF-κB может оказаться его способность стимулировать образование остеолитических метастазов РМЖ в костях [9].

Предполагается, что создание противоопухолевых агентов, блокирующих NF-κB сигнальный путь, позволит повысить чувствительность клеток к существующим видам терапии, а также может иметь самостоятельное терапевтическое значение, в том числе и для предотвращения метастазирования РМЖ в кости [4; 12].

Однако большинство доказательств определяющего значения NF-κB сигнального каскада при РМЖ получено в экспериментальных системах, а данные об экспрессии и активности этого фактора в опухолях человека немногочисленны, получены различными методами и требуют дальнейшего подтверждения и развития [1; 7; 11; 15].

Цель данного исследования – сравнительная оценка уровня экспрессии (общего содержания) и ДНК-связывающей активности одного из ключевых белков семейства NF-κB – p65 – в опухолях и окружающих гистологически неизмененных тканях больных РМЖ, а также анализ взаимосвязи этих показателей с рецепторным статусом опухоли и основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

Методика исследования

В исследование вошли 119 больных раком молочной железы в возрасте от 23 до 84 лет (медиана – 54 года). Репродуктивная функция была сохранена у 37 больных, 18 находились в состоянии пременопаузы, и у 64 была менопауза различной длительности. Больные распределялись по стадиям заболевания следующим образом: IА – 37, IВ – 28, по 20 больных I и IА стадиях, и у 14 больных был распространенный процесс IВ – IС стадиях.

По гистологическому строению 95 опухолей представляли собой протоковый инфильтративный рак, 14 – дольковый инфильтративный, другие типы РМЖ представлены единичными наблюдениями. Большинство опухолей (84) имели II, 28 – III, и 7 – I степень злокачественности. Во всех опухолях иммуногистохимическими методами определен статус рецепторов эстрогенов (РЭ), рецепторов прогестерона (РП) и HER2/neu.

Образцы опухолевой и гистологически неизменной ткани молочной железы (200-500 мг) для исследования NF-κBp65 брали во время операции и хранили при –70°C. Затем измельчали их в порошок в жидком азоте и лизировали в соотношении 1:3 в буфере следующего состава: 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1% Тритон X-100, 2,5 мМ пирогликофосфат натрия, 1 мМ β-глицерофосфат, 1 мМ ортованадат натрия, 1 мкг/мл леупептина. Лизаты центрифугировали при 20000 об/мин, 30 мин, 4°C (центрифуга Optima™ TLX, Beckman, США).

Суммарное содержание NF-κBp65 в полученных ядерно-цитоплазматических экстрактах тканей определяли с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа «NF-κBp65 (Total)» (Invitrogen, США) в соответствии с инструк-

циями производителя после предварительного разведения в 150 раз. Содержание NF-κBp65 выражали в нанограммах на 1 мг общего белка, определенного по методу Лоури.

ДНК-связывающую активность NF-κBp65 измеряли, используя наборы «TransAM NFκB p65» (Active Motif, США). Принцип метода заключается в следующем: активированный NF-κBp65 специфически связывается с иммобилизованным на 96-луночной планшете олигонуклеотидом, содержащим консенсусную последовательность 5'-GGGACCTTCC-3', после чего проводится стандартное прямое иммуноферментное определение количества связавшегося белка NF-κBp65 с колориметрической детекцией при 450 нм. Для построения калибровочной использовали ядерный экстракт активированных (TPA + CI) клеток Jurkat, ДНК-связывающую активность которого принимали за 100 единиц (Ед). ДНК-связывающую активность NF-κBp65 в исследуемых образцах выражали в Ед/мг общего белка.

Измерения проводили на автоматическом универсальном ридере для микропланшет ELx800 (Bio-Tek Instruments Inc., США).

Данные обрабатывали с помощью программы «Statistica 7.0». При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические методы: критерии Манна-Уитни и Kruskal-Wallis, тест корреляции рангов Спирмена (R). Различия и корреляции считали достоверными при p<0,05.

Результаты исследования

Измеримые количества общего белка NF-κBp65 (0,66 – 67,2; медиана – 11,1 нг/мг белка) обнаружены в 118 образцах рака (99%) и в 96 образцах (81%) гистологически неизменной ткани молочной железы (0,05 – 42,5; медиана – 2,9 нг/мг белка).

Содержание NF-κBp65 в опухоли было достоверно выше, чем в окружающей ткани у 86% больных РМЖ (p<0,0001). У 99% больных выявлена измеримая ДНК-связывающая активность NF-κBp65 в опухоли (1,0 – 711; медиана – 193 Ед/мг белка) и у 81% – в окружающей ткани (0,14 – 143; медиана – 28,7 Ед/мг белка), причем этот показатель был достоверно повышен в опухоли по сравнению с окружающей тканью в 97% случаев (p<0,0001).

Содержание и ДНК-связывающая активность NF-κBp65 в опухоли не коррелировали с соответствующими показателями неизменной молочной железы. В то же время, как в опухоли, так и в нормальной ткани отмечена слабая, но достоверная положительная корреляционная взаимосвязь между общим уровнем белка NF-κBp65 и его ДНК-связывающей активностью (R=0,31, p<0,01 и R=0,26, p<0,05 соответственно).

Таким образом, практически во всех РМЖ наблюдается усиление ДНК-связывающей активности NF-κBp65, в большинстве случаев сопровождающееся также увеличением количества общего белка этого транскрипционного фактора.

Однако увеличение активности NF-κBp65 носит более выраженный характер, чем увеличение количества общего белка: ДНК-связывающая активность превышает верхнюю 95% границу нормальных значений (118 Ед/мг белка) в 81% случаев, а содержание общего белка – только в 18% (95% граница нормы – 26,7 нг/мг белка).

Это наблюдение соответствует представлению об относительной независимости активации транскрипционного фактора NF-κB в опухолях от синтеза этого белка *de novo*.

Для оценки взаимосвязи уровня экспрессии и ДНК-связывающей активности NF-κBp65 с клиническо-морфологическими особенностями РМЖ исследовали, помимо основных, еще 3 расчетных показателя: увеличение содержания белка p65 и увеличение его активности в опухоли по сравнению с окружающей тканью (Т-Н), а также соотношение активности и общего содержания (удельную активность) NF-κBp65 в опухолевой ткани. Достоверной взаимосвязи с такими клиническо-морфологическими факторами как стадия заболевания, размер (индекс Т) и гистологическое строение опухоли, степень поражения лимфатических узлов (индекс N) ни для одного из показателей не обнаружено.

Содержание общего белка NF-κBp65 в низкодифференцированных опухолях III степени злокачественности (1,7 – 67,2; медиана 17,7 нг/мг белка) было достоверно выше, чем в умеренно дифференцированных опухолях II степени злокачественности (0 – 58,3; медиана – 9,5 нг/мг белка; $p < 0,05$). Другие исследованные показатели не зависели от степени злокачественности РМЖ. Учитывая роль активации NF-κB-сигнального пути в регуляции гормональной и лекарственной чувствительности РМЖ, особый интерес представляла оценка взаимосвязи экспрессии и ДНК-связывающей активности одной из его субъединиц с рецепторным статусом опухоли. В таблице суммированы данные по наиболее клинически значимым группам опухолей с различным рецепторным статусом. Достоверных различий в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов ни для одного из показателей не обнаружено, хотя можно отметить тенденцию к увеличению содержания и ДНК-связывающей активности NF-κBp65 в РЭ-отрицательных опухолях по сравнению с РЭ-положительными.

В то же время достоверное увеличение содержания общего белка NF-κBp65 ($p < 0,01$) и его изменения по отношению к норме ($p < 0,01$), а также снижение удельной активности NF-κBp65 ($p < 0,05$) наблюдается в HER2-положительных опухолях по сравнению с HER2-отрицательными. При анализе сочетаний из трех видов рецепторов выявлены следующие закономерности: 1) значительное снижение удельной активности NF-κBp65 в РЭ РП HER2⁺ опухолях, высоко достоверное по сравнению с РЭ РП HER2⁻ ($p < 0,01$); 2) наибольшее увеличение ДНК-связывающей активности NF-κBp65 по сравнению с окружающей тканью в опухолях, отрицательных по трем видам рецепторов ($p < 0,05$ по отношению к РЭ РП HER2⁻ опухолям); 3) наконец, при сравнении опухолей с двумя классическими сочетаниями рецепторов – РЭ РП HER2⁺ и РЭ РП HER2⁻ – обнаружено достоверное увеличение суммарного содержания и прироста общего белка NF-κBp65 в первой подгруппе по сравнению со второй ($p < 0,05$). Таким образом, по нашим данным, в HER2⁺ опухолях молочной железы происходит увеличение общей экспрессии белка NF-κBp65, не зависящее от статуса рецепторов стероидных гормонов и не сопровождающееся увеличением ДНК-связывающей активности. В то же время, общая и удельная ДНК-связывающая активность NF-κBp65 наиболее высока в опухолях с так называемым «тройным отрицательным» рецепторным статусом, не поддающихся ни эндокринной, ни молекулярно-направленной терапии, поэтому возможно, что именно эта подгруппа больных РМЖ получит преимущество от использования селективных ингибиторов NF-κB.

Исследование поддержано РФФИ, грант 09-03-00042.

Таблица

Содержание и ДНК-связывающая активность NF-κBp65 в ядерно-цитоплазматических экстрактах рака молочной железы в зависимости от рецепторного статуса опухоли[#]

Рецепторный статус	Число образцов	Общий NF-κBp65 нг/мг белка		ДНК-связывающая активность NF-κBp65 Ед/мг белка		Удельная ДНК-связывающая активность Ед/нг NF-κBp65
		Содержание в опухоли	Изменение по сравнению с неизменной тканью (Т-Н)	Активность в опухоли	Изменение по сравнению с неизменной тканью (Т-Н)	
РЭ ⁺	81	8,95 0 – 67,2	6,83 –28,1 – 67,1	187 0 – 640	158 –28,7 – 557	15,7 0 – 182
РЭ ⁻	34	13,7 2,1 – 46,5	9,49 –18,7 – 46,5	223 63,5 – 497	196 63,5 – 447	15,8 3,42 – 77,8
РЭ РП ⁺	65	9,47 0 – 58,3	7,17 –20,4 – 55,8	193 0,98 – 640	162 –28,7 – 557	19,3 0,34 – 182
РЭ РП ⁻	31	13,3 2,08 – 46,5	9,12 –18,7 – 46,5	212 63,5 – 497	193 63,5 – 447	16,0 3,42 – 77,8
HER2 ⁺	18	18,4 4,25 – 67,2	15,4 2,21 – 67,2	166 63,5 – 497	160 63,5 – 402	9,29 3,42 – 45,3
HER2 ⁻	97	9,73 ¹ 0 – 58,3	6,96 ¹ –28,1 – 55,8	191 0 – 640	171 –28,7 – 557	16,7 ² 0 – 182
РЭ РП HER2 ⁻	62	9,38 0 – 58,3	7,0 –20,4 – 55,8	193 0,98 – 640	162 –28,7 – 557	19,3 0,34 – 182
РЭ РП HER2 ⁺	3	21,8 7,41 – 33,7	20,2 5,08 – 33,7	202 131 – 272	185 101 – 268	20,3 3,90 – 36,7
РЭ РП HER2 ⁺	13	18,3 ⁴ 4,25 – 46,5	14,8 ⁴ 2,21 – 46,5	158 63,5 – 497	149 63,5 – 358	9,29 ³ 3,42 – 37,2
РЭ РП HER2 ⁻	18	10,2 2,08 – 34,4	7,12 –18,7 – 34,4	282 123 – 450	231 ⁴ 118 – 447	27,5 8,35 – 77,8

[#]Представлены медианы и диапазоны значений.

¹ $p < 0,01$ по сравнению с HER2⁺ опухолями

² $p < 0,05$ по сравнению с HER2⁺ опухолями

³ $p < 0,01$ по сравнению с РЭ РП HER2⁻ опухолями

⁴ $p < 0,05$ по сравнению с РЭ РП HER2⁻ опухолями

Литература

1. Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К., Кушлинский Н.Е. Роль ядерного транскрипционного фактора NF-каппа В в этиологии, патогенезе и клиническом течении рака молочной железы // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.-2009.-Vol. (5).-P. 10-13.
2. Лобанова Ю.С., Щербаков А.М., Шатская В.А., Красильников М.А. Эстроген-зависимый апоптоз в клетках рака молочной железы: роль сигнального пути, регулируемого NF-kB. // Биохимия.-2007.-Vol. 72 (3).-P. 392-401.
3. Ahmed K.M., Cao N., Li J.J. HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer // Anticancer Res.-2006.-Vol. 26 (6B).-P. 4235-4243.
4. Baldwin A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB // J Clin Invest.-2001.-Vol. 107 (3).-P. 241-246.
5. Biswas D.K., Iglehart J.D. Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signaling in breast cancer // J Cell Physiol.-2006.-Vol. 209 (3).-P. 645-652.
6. Biswas D.K., Shi Q., Baily S. et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis // Proc Natl Acad Sci U S A.-2004.-Vol. 101 (27).-P. 10137-10142.
7. Cogswell P.C., Guttridge D.C., Funkhouser W.K., Baldwin A.S., Jr. Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3 // Oncogene.-2000.-Vol. 19 (9).-P. 1123-1131.
8. Hernandez-Vargas H., Rodriguez-Pinilla S.M., Julian-Tendero M. et al. Gene expression profiling of breast cancer cells in response to gemcitabine: NF-kappaB pathway activation as a potential mechanism of resistance // Breast Cancer Res Treat.-2007.-Vol. 102 (2).-P. 157-172.
9. Park B.K., Zhang H., Zeng Q. et al. NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF // Nat Med.-2007.-Vol. 13 (1).-P. 62-69.
10. Russo S.M., Tepper J.E., Baldwin A.S., Jr. et al. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB // Int J Radiat Oncol Biol Phys.-2001.-Vol. 50 (1).-P. 183-193.
11. Van Laere S.J., Van der Auwera I., Van den Eynden G.G. et al. NF-kappaB activation in inflammatory breast cancer is associated with oestrogen receptor downregulation, secondary to EGFR and/or ErbB2 overexpression and MAPK hyperactivation // Br J Cancer.-2007.-Vol. 97 (5).-P. 659-669.
12. Wu J.T., Kral J.G. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy // J Surg Res.-2005.-Vol. 123 (1).-P. 158-169.
13. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Eppenberger U., Benz C.C. The NFkappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer // Endocr Relat Cancer.-2005.-Vol. 12 Suppl 1.-P. S37-46.
14. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Marx C. et al. Activation of nuclear factor-kappaB (NFkappaB) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers // Int J Biochem Cell Biol.-2005.-Vol. 37 (5).-P. 1130-1144.
15. Zhou Y., Yau C., Gray J.W. et al. Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer // BMC Cancer.-2007.-Vol. 7.-P. 59.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 618.19-006.6:616.15:577.112.854

А.И. Катунина, Е.С. Герштейн, В.Д. Ермилова, И.В. Терешкина, А.Ю. Назаренко, А.А. Тулеуова, О.В. Кузнецова, З.К. Карабекова, М.В. Грицкевич, Е.К. Дворова, Т.Т. Березов

**СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 2; 7 И 9
В ОПУХОЛЯХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Герштейн Елена Сергеевна, Лаборатория клинической биохимии

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.** +7(495)324-11-59; **факс** +7(495)324-63-52;

e-mail: esgershtein@gmail.com

Статья поступила: 01.09.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Иммуноферментными методами показано, что содержание ММП 2 и 7 повышено в опухолях по сравнению с окружающей гистологически неизменной тканью у 91 и 76 % больных раком молочной железы соответственно, а уровни ММП–9 в опухолях и неизменной ткани достоверно не отличаются. Концентрации ММП–2 и ММП–7 в сыворотке крови не коррелируют с соответствующими показателями в опухолях, не превышают норму и достоверно не снижаются после удаления первичной опухоли. Уровень ММП–9 в сыворотке крови больных достоверно ниже, чем в таковой группы контроля, а после операции повышается в 85% случаев. Однозначной взаимосвязи исследованных показателей с клинико-морфологическими факторами прогноза РМЖ не обнаружено.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы 2; 7; 9, рак молочной железы.

A.I. Katunina, E.S. Gershtein, I.V. Tereshkina, A.Yu. Nazarenko, V.D. Ermilova, A.A. Tuleuova, O.V. Kuznetsova, Z.K. Karabekova, M.V. Gritskevich, E.K. Dvorova, T.T. Berezov

**CONTENT OF MATRIX METALLOPRONEINASES 2; 7 AND 9
IN THE TUMORS AND BLOOD SERUM OF BREAST CANCER PATIENTS**
Russian N.N.Blokhin Cancer Research Center RAMS;

Abstract

A significant increase of matrix metalloproteinases' (MMP) 2 and 7 levels in the tumors as compared to adjacent histologically unchanged mammary gland was demonstrated by enzyme-linked immunosorbent assays in 91 and 76% of breast cancer patients respectively, while MMP–9 levels in these tissues did not differ significantly. The concentrations of MMP–2 and MMP–7 in blood serum were not associated with corresponding tumor values, did not exceed the control levels, and did not decrease after the excision of primary tumor. Serum MMP–9 was significantly decreased in breast cancer patients as compared to control group, and increased post-surgically in 85% of the patients. No unambiguous associations between the parameters studied and breast cancer clinico-morphologic prognostic factors were revealed.

Key words: matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 7, matrix metalloproteinase 9, breast cancer.

Введение

Одним из основных механизмов инвазии злокачественных опухолей является разрушение окружающей базальной мембраны и ВКМ ассоциированными с опухолью протеазами, играющими также важную роль в процессах метастазирования и неоангиогенеза. В инвазии и метастазировании задействовано несколько классов протеаз, в том числе – мультигенное семейство матриксных металлопротеиназ или матриксинов, названных так за свою способность специфически гидролизовать все основные ВКМ и состоящее из более чем 20 секретируемых или связанных с поверхностью клетки цинк-зависимых эндопептидаз [9].

Субстратами ММП помимо большинства компонентов ВКМ могут быть также другие протеазы, хемотаксические молекулы, латентные формы факторов роста, растворимые и мембранно-ассоциированные белки, связывающие факторы роста [7].

Активность ММП в межклеточном пространстве специфически подавляется ТИМП – структурно родственными белками, три из которых (ТИМП–1; 2 и 4) секретируются в растворимой форме, а один (ТИМП–3) связан с ВКМ. ТИМП играют также важную самостоятельную роль в регуляции роста и диф-

ференцировки опухолевых и нормальных клеток и обладают антиангиогенными свойствами [4]. В определенной степени антиангиогенной активностью обладают и сами ММП, поскольку они участвуют в образовании антиангиогенных пептидов из более крупных белков [6; 10].

Для многих ММП продемонстрировано увеличение экспрессии и активности в опухолях различного генеза, причем эта активация происходит по паракринному механизму с участием факторов роста и цитокинов, секретируемых инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, а также клетками опухолевой стромы [9; 15]. В связи с этим различные ММП и ТИМП рассматриваются в настоящее время в качестве возможных биологических маркеров прогноза и лекарственной чувствительности злокачественных опухолей. Использование природных и синтетических ингибиторов ММП считается перспективным подходом к противоопухолевой терапии. В экспериментальных исследованиях продемонстрировано участие ММП в регуляции инвазивной, миграционной и даже пролиферативной активности РМЖ. Возможность подавления распространения опухоли с помощью синтетических ингибиторов ММП также является предметом исследований [6; 11–14].

Данные о роли ММП в прогнозе и клиническом течении РМЖ не очень многочисленны и единого мнения по этому вопросу пока нет [5; 8; 13; 15].

Цель данного исследования – провести сравнительную оценку содержания ММП–2; 7 и 9 в опухолях и гистологически неизменной ткани больных РМЖ, а также в сыворотке крови этих больных до и после операции и проанализировать взаимосвязь изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

Материалы и методы

В исследование включили 45 больных раком молочной железы I–III стадий в возрасте от 26 до 73 лет (медиана – 54 года). Контрольную группу составили 8 практически здоровых женщин. Стадии заболевания: I – 10, IIА и IIВ – по 12, IIIА – 6, и у 5 пациенток был распространенный процесс IIВ–С стадии. По гистологическому строению 36 опухолей представляли собой протоковый инфильтративный рак, 5 – дольковый инфильтративный рак, другие типы РМЖ представлены единичными наблюдениями. Умеренная степень дифференцировки РМЖ выявлена у большинства пациенток (33), низкая – у 7, высокая – у 5. Во всех опухолях иммуногистохимически исследована экспрессия рецепторов: эстрогенов, прогестерона и HER2/neu.

Содержание ММП–2; 7; 9 определяли в экстрактах опухолей и участках гистологически неизменной ткани молочной железы, а также в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала лечения и через 5–15 дней после операции. Для проведения иммуноферментного анализа образцы тканей лизировали в соотношении 1 : 3 в буфере следующего состава:

20 mM Трис-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 %-ный Тритон X-100, 2,5 mM пироглутамат натрия, 1 mM β -глицерофосфат, 1 mM ортованадат натрия, 1 мкг/мл леупептина. Полученные лизаты центрифугировали в течение 30 мин при 20 000 об/мин, +4 °C (центрифуга Optima™ TLX, «Beckman», USA). Определение проводили с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа: «Human/Mouse/Rat MMP-2 (total)», «Human MMP-7 (total)», «Human MMP-9 (total)» (все – Quantikine®, «R&D Systems», USA) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом универсальном ридере для микропланшет ELx800 («Bio-Tek Instruments, Inc.», USA). Концентрацию исследованных показателей в тканях выражали в нанограммах (нг) на 1 мг общего белка, определенного по методу Лоури.

Данные обрабатывали с помощью программы «Statistica 7.0». При сравнении и анализе взаимосвязей различных показателей использовали непараметрические методы: критерии Манна-Уитни и Kruskal-Wallis, тест корреляции рангов Спирмена (R). Различия и корреляции считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Во всех исследованных образцах опухолей и гистологически неизменной ткани молочной железы обнаружены измеримые количества ММП–2 и ММП–7, а ММП–9 выявлена в 30 из 40 (75%) опухолей и в 63% образцов неизменной молочной железы. Содержание ММП–2 и 7 достоверно повышено в опухолях по сравнению с гистологически неизменной тканью молочной железы у 91 и 76% больных соответственно (табл. 1). У 61% больных

отмечено также увеличение содержания ММП–9 в опухоли по сравнению с неизменной тканью, однако в целом по группе различия не достигали статистической значимости (табл. 1).

При этом уровни ММП–9 в опухолях и неизменной молочной железе достоверно положительно коррелировали между собой ($R=0,36$; $p < 0,05$), а для ММП–2 и ММП–7 такой взаимосвязи не обнаружено. Кроме того, отмечена положительная взаимосвязь между уровнями ММП–2 и ММП–7, а также ММП–7 и ММП–9 в опухолях ($R=0,49$ и $R=0,48$ соответственно; $p < 0,05$).

Таким образом, в опухолях обследованных больных РМЖ значимо увеличена экспрессия ММП–2 и ММП–7, что соответствует данным ряда авторов, продемонстрировавших важную роль этих белков в патогенезе РМЖ [7; 12; 15]. Достоверного увеличения экспрессии ММП–9 нами не обнаружено, однако в литературе представлены данные об активации этой протеиназы в опухолях молочной железы, полученные другими методами [5; 15].

При исследовании сыворотки крови не выявлено достоверного повышения концентрации ММП–2 и ММП–7 у больных РМЖ по сравнению с контрольной группой, а уровень ММП–9 в сыворотке крови больных оказался достоверно ниже, чем в контроле (табл. 2).

Ни для одного из исследованных показателей не выявлено достоверных корреляционных взаимосвязей тканевых и сывороточных концентраций, что может свидетельствовать о неопухоловом происхождении ММП, циркулирующих в периферической крови больных РМЖ.

В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что после удаления первичной опухоли уровни ММП–2 и ММП–7 снизились только у половины больных, и это изменение не было статистически значимым и составляло всего 0,2–51% для ММП–2 и 2,5–39% для ММП–7 (табл. 2). Уровень ММП–9, сниженный до операции, напротив, повысился на 0,8–75% ($p < 0,0001$) у 85% больных, но оставался ниже контрольного (табл. 2).

Для того, чтобы оценить клиническое значение определения исследуемых маркеров в опухолях и периферической крови больных РМЖ, проанализировали взаимосвязь этих показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания: стадией, размером, гистологическим строением, степенью дифференцировки и рецепторным статусом первичной опухоли (табл. 3), наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах.

Обнаружено достоверное увеличение содержания ММП–9 в опухоли со снижением степени дифференцировки, что косвенно свидетельствует о неблагоприятной прогностической роли высокого уровня этой протеиназы в РМЖ.

Повышение уровня ММП–9, а также ММП–7 отмечено и в опухолях с прогностически неблагоприятным рецепторным статусом – R^- ($p < 0,05$) и/или HER2/neu⁺.

Уровень ММП–2 практически не зависел от статуса R^- и HER2/neu, но был более высок в R^+ опухолях ($p < 0,05$), чем в R^- -отрицательных.

Основные закономерности, выявленные для показателей сыворотки крови, – это достоверное увеличение уровня ММП–2 ($p < 0,05$) и снижение уровня ММП–9 при III стадии РМЖ по сравнению с I–II ($p < 0,05$). Уровень ММП–9 в сыворотке крови также достоверно снижался при низкодифференцированном РМЖ и размере первичной опухоли более 4,0 см (в обоих случаях $p < 0,05$).

Таблица 1

Содержание (нг/мг белка) ММП-2, ММП-7 и ММП-9 в опухолях и гистологически неизменной ткани МЖ

Показатель	п больных	Опухоль (Т)		Слизистая (N)		T>N %
		Медиана	Диапазон	Медиана	Диапазон	
ММП-2	45	40,1 ¹	3,6 – 111	10,5	2,3 – 67,3	91
ММП-7	25	0,7 ²	0,04 – 15,0	0,2	0,03 – 2,2	76
ММП-9	40	8,2	0 – 294	2,7	0 – 225	61

¹p<0,0001 по сравнению с неизменной тканью (парный критерий Вилкоксона);²p<0,01 по сравнению с неизменной тканью (парный критерий Вилкоксона).

Таблица 2

Содержание (нг/мл) ММП-2, ММП-7 и ММП-9 в сыворотке крови здоровых доноров и больных РМЖ до начала лечения и через 5-15 дней после операции

Показатель	Контрольная группа (8 человек)	Больные РМЖ			
		п больных	до операции (1)	после операции (2)	снижение (2<1)
ММП-2	256 161 – 303	45	228 151-389	245 153-361	52%
ММП-7	3,9 2,8 – 4,5	25	4,05 1,9-9,4	4,132,8-11,0	52%
ММП-9	398 279 – 496	40	229 ¹ 87-446	284 ² 136-847	15%

¹p<0,05 по отношению к показателю контрольной группы (тест Манна-Уитни);²p<0,0001 по отношению к показателю до операции (парный критерий Вилкоксона).

Таблица 3

Содержание ММП-2, ММП-7 и ММП-9 в опухолях (нг/мг белка) и сыворотке крови (нг/мл) при РМЖ в зависимости от некоторых клинико-морфологических характеристик заболевания*

Показатель	ММП-2		ММП-7		ММП-9	
	Опухоль	Сыворотка	Опухоль	Сыворотка	Опухоль	Сыворотка
<u>Стадия:</u> I	45,2 21,3-61,4	229 185-294	1,6 0,3-1,8	3,8 3,5-4,5	0 0-8,1	217 167-314
II	35,0 22,1-52,8	235 193-229	0,6 0,2-1,4	4,7 3,5-4,0	8,6 2,2-18,6	254 221-314
III	40,1 27,9-64,0	280 242-316	0,8 0,6-1,3	4,6 4,1-5,1	13,6 0-25,1	210 140-265
<u>Размер опухоли:</u> до 2,0 см	31,7 21,3-46,9	265 201-315	1,1 0,6-4,1	3,8 3,5-5,2	0 0-52,6	304 182-446
2-3,9 см	42,4 22,4-64,0	242 222-265	0,6 0,3-1,0	4,6 3,7-4,1	8,8 1,8-18,6	225 167-253
4,0 см и более	47,2 36,5-69,2	227 193-265	1,8 1,4-2,2	3,9 3,5-5,2	11,1 0-14,1	182 145-223
<u>Степень дифференцировки:</u> 1 Высокая	37,8 19,6-65,1	221 207-235	1,0 0,1-1,8	3,8 3,5-4,0	0,9 0-5,2	223 167-279
2 Умеренная	41,9 26,3-56,4	248 193-315	0,7 0,4-1,6	4,6 3,7-5,2	8,8 0,6-19,6	250 187-314
3 Низкая	36,9 24,9-66,2	241 201-280	1,0 0,6-1,4	3,9 3,5-4,3	13,9 5,2-114	167 126-241
<u>Рецепторный статус:</u> РЭ ⁺	36,9 22,4-36,9	252 193-294	1,8 1,3-4,1	3,8 3,5-5,2	24,0 18,6-80	213 176-304
РЭ ⁻	42,4 26,4-61,4	243 223-309	0,6 0,3-1,4	4,6 3,7-4,1	3,9 0-11,5	236 145-275
РП ⁺	31,7 22,4-45,6	242 193-315	1,1 0,6-1,8	4,3 3,5-5,2	18,4 0,3-28,6	219 167-314
РП ⁻	46,2 32,8-68,1	248 222-265	0,7 0,3-1,4	4,7 3,9-4,5	4,7 0-11,9	238 165-262
HER2/neu ⁺	41,3 26,3-56,4	246 201-308	0,7 0,4-1,6	4,6 3,9-4,2	7,6 0-19,6	232 182-253
HER2/neu ⁻	40,1 22,4-64,0	241 196-294	2,6 1,0-4,1	4,1 3,6-5,1	12,8 5,8-16,4	217 167-304

*в таблице представлены медианы и квартили значений; статистически достоверные различия указаны в тексте статьи.

Подводя итог проведенным исследованиям, отметим:

- у большинства пациенток, страдающих РМЖ, отмечено значительное увеличение продукции ММП–2 и ММП–7 в опухоли по сравнению с окружающей гистологически неизменной тканью молочной железы.
- уровень этих протеиназ в сыворотке крови больных практически не отличается от показателей контрольной группы и достоверно не меняется после удаления опухоли.
- в опухолях значительной части больных повышена также экспрессия ММП–9, однако ее увеличение менее выражено, чем для вышеуказанных показателей и не достигает уровня статистической значимости.

Достаточно парадоксальным и требующим дальнейшего изучения является тот факт, что концентрация ММП–9 в сыворотке крови больных достоверно снижена по сравнению с нормой, это снижение в наибольшей степени проявляется в некоторых прогностически неблагоприятных подгруппах, а после операции происходит нормализация уровня ММП–9, т.е. его повышение.

Следует отметить, что аналогичное снижение уровня ММП–9 мы наблюдали при раке желудка [3], а при раке яичников [2] и раке толстой кишки [1] уровень этого маркера в периферической крови, напротив, был повышен.

Таким образом, по данным нашего исследования, все три изученных ММП можно рассматривать в качестве возможных биомаркеров РМЖ и мишеней для молекулярно-направленной терапии, но они не являются перспективными серологическими маркерами данного заболевания.

Литература

1. Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Щербаков А.М. и соавт. Матриксные металлопротеиназы 7 и 9 и их тканевые ингибиторы 1 и 4 типа в опухолях и плазме крови больных раком толстой кишки // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2007. – Т. 143. – №4. – С. 438–41.
2. Герштейн Е.С., Левкина Н.В., Дигаева М.А. и соавт. Матриксные металлопротеиназы 2, 7, 9 и тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ 1 типа в опухолях и сыворотке крови больных новообразованиями яичников // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2010. – Т. 149. – №5. – С. 562–5.
3. Герштейн Е.С., Ли Сун, Рябов А.Б. и соавт. Сравнительное иммуноферментное исследование матриксных металлопротеиназ-2, -7, -9 и их тканевого ингибитора 2 типа в опухолях и плазме крови больных раком желудка // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2009. – Т. 148. – №12. – С. 660–3.
4. Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities // J. Cell Sci. – 2002. – Vol. 115 (Pt 19). – P. 3719–27.
5. Bartsch J.E., Staren E.D., Appert H.E. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer // J. Surg. Res. – 2003. – Vol. 110 (2). – P. 383–92.
6. Bendrik C., Robertson J., Gaudie J., Dabrosin C. Gene transfer of matrix metalloproteinase-9 induces tumor regression of breast cancer *in vivo* // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68 (9). – P. 3405–12.
7. Dean R.A., Butler G.S., Hamma-Kourbali Y. et al. Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis // Mol. Cell Biol. – 2007. – Vol. 27 (24). – P. 8454–65.
8. Decock J., Long J.R., Laxton R.C. et al. Association of matrix metalloproteinase-8 gene variation with breast cancer prognosis // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67 (21). – P. 10214–21.
9. Deryugina E.I., Quigley J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis // Cancer Metastasis Rev. – 2006. – Vol. 25 (1). – P. 9–34.
10. Deryugina E.I., Quigley J.P. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – Vol. 1803 (1). – P. 103–20.
11. Glasspool R.M., Twelves C.J. Matrix metalloproteinase inhibitors: past lessons and future prospects in breast cancer // Breast. – 2001. – Vol. 10 (5). – P. 368–78.
12. Kargozaran H., Yuan S.Y., Breslin J.W. et al. A role for endothelial-derived matrix metalloproteinase-2 in breast cancer cell transmigration across the endothelial-basement membrane barrier // Clin. Exp. Metastasis. – 2007. – Vol. 24 (7). – P. 495–502.
13. Liu S.C., Yang S.F., Yeh K.T. et al. Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer // Clin. Chim. Acta. – 2006. – Vol. 371 (1–2). – P. 92–6.
14. Lungu G., Covalada L., Mendes O. et al. FGF-1-induced matrix metalloproteinase-9 expression in breast cancer cells is mediated by increased activities of NF-kappaB and activating protein-1 // Mol. Carcinogenesis. – 2008. – Vol. 47 (6). – P. 424–35.
15. McGowan P.M., Duffy M.J. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database // Ann. Oncol. – 2008. – Vol. 19 (9). – P. 1566–72.

УДК 616.248:611.018.53:577.112

А.В. Караулов¹, Н.Ю. Анисимова², Ю.И. Должикова², С.И. Сокурено^{1,3}, В.Ф. Ликов¹,
Т.В. Борисова¹, М.В. Киселевский²

**СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ
В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ**

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

³83 КБ ФМБА России

Контактная информация:

Караулов Александр Викторович, профессор, член-корр. РАМН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии

адрес: 119992, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2; тел. +7(495)395-64-97;

e-mail: karaulov@mtu-net.ru

Статья поступила: 19.08.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Цитокины играют важную роль в патогенезе астмы, участвуя в формировании аллергического воспалительного ответа. Особое значение при аллергических заболеваниях имеет определяемый цитокинами баланс двух основных типов Т-хелперов: Th1 и Th2. Целью настоящего исследования было изучение уровня сывороточных цитокинов, а также их спонтанной и индуцированной продукции лейкоцитами периферической крови у больных бронхиальной астмой в стадии обострения. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что у больных бронхиальной астмой в стадии обострения отмечаются повышенные концентрации в крови, как про- так и противовоспалительных цитокинов. Данные изменения цитокинового профиля сопровождаются увеличением спонтанной продукции медиаторов воспаления, при этом стимуляция синтеза и секреции цитокинов у больных бронхиальной астмой, в отличие от здоровых доноров не всегда приводит к повышению их индуцированной продукции.

Ключевые слова: цитокины, бронхиальная астма.

A.V. Karaulov¹, N.Yu. Anisimova², Yu.I. Dolzhikova², S.I. Sokurenko^{1,3}, V.F. Likov¹,
T.V. Borisova¹, M.V. Kiselevsky²

**SPONTANEOUS AND INDUCED CYTOKINES PRODUCTION
BY PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES
IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA**

¹I.M. Sechenov State Medical University, Moscow

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

³Hospital №83, Moscow

Abstract

The role of cytokines in asthma pathogenesis is well documented. The balance between two types T-helpers, Th1 and Th2, is the main player in allergic diseases. The aim of our study was to measure the level of serum cytokines depending on spontaneous or induced release by peripheral blood leukocytes in patients with bronchial asthma at the acute condition of disease. The data obtained indicate that the level either pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines was increased in patients with bronchial asthma at the acute condition of disease. We observed the elevated level of spontaneous production of inflammatory mediator. Moreover, the stimulation of cytokines synthesis and release in patients with bronchial asthma does not result in increased induced level of cytokines in differ from healthy donors.

Key words: cytokines, bronchial asthma.

Введение

Цитокины играют важную роль в патогенезе астмы, участвуя в формировании аллергического воспалительного ответа. Особое значение при аллергических заболеваниях имеет определяемый цитокинами баланс двух основных типов Т-хелперов: Th1 и Th2 [5; 7].

Исследования последних десятилетий показали, что в механизм развития астмы вовлечены многочисленные цитокины и хемокины [1–6; 13]. В то время как провоспалительные цитокины, такие как ИЛ–1, ФНО–α и ИЛ–6, индуцируют воспалительные процессы, цитокины Th2- типа (ИЛ–4, ИЛ–5, ИЛ–9) и ИЛ–13 участвуют в развитии аллергических состояний [13].

Особое значение при астме придается ИЛ–4, который регулирует аллергические реакции за счет индукции дифференцировки Th2 клеток и синтеза IgE [14]. ИЛ–5 участвует в эозинофильном воспалении, его значимость в этом процессе подтверждается тем, что блокада этого цитокина моноклональными антителами ингибирует эозинофильную инфильтрацию дыхательных путей. [7; 9; 10].

ИЛ–13 также как ИЛ–4 модулирует продукцию IgE, но, в отличие от ИЛ–4, это не влияет на дифференцировку Т-клеток [15]. ИЛ–9 менее исследован, чем другие Th2-цитокины, но, он способен усиливать эффекты других Th2-цитокинов [16].

Причины, по которым Th2–клетки играют более важную роль при аллергических заболеваниях, таких как астма, остаются неизвестными.

Однако предполагается, что это явление может быть следствием недостаточного контакта организма с инфекцией. Отсутствие стимулирующего действия бактериальных факторов, в частности, эндотоксинов, может изменить баланс между Th1 и Th2 клетками. Генетические полиморфизмы также могут быть одним из факторов предрасположенности к дисбалансу между Th1- и Th2-клетками [12].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных изучению цитокинового профиля у больных бронхиальной астмой, до настоящего времени отсутствуют четкие представления о характере и степени изменений продукции рассматриваемых эндогенных биорегуляторов. Очевидно, это связано с различиями в исследуемых группах больных и, прежде всего, с состоянием пациентов на момент обследования.

Кроме того, следует отметить, что в большинстве работ оценивался только уровень сывороточных цитокинов, который не всегда может быть достаточно информативным.

Поэтому целью настоящего исследования было изучение уровня сывороточных цитокинов, а также их спонтанной и индуцированной продукции лейкоцитами периферической крови у больных бронхиальной астмой в стадии обострения.

Материалы и методы

Для определения цитокинового профиля использовали образцы сыворотки крови больных бронхиальной астмой (n=15) и здоровых доноров (n=16). Определение спонтанной и стимулированной продукции цитокинов клетками крови проводили с использованием наборов реагентов «Цитокин-Стимул-Бест» («Вектор Бест», РФ).

В соответствии с инструкцией цельную кровь разводили в 5 раз, одну часть инкубировали в культуральной среде без добавок (спонтанная продукция цитокинов), а другую в среде с комплексным митогеном ФГА, конканавалин А и липополисахарид (индуцированная продукция цитокинов).

Культирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 4,5% CO₂ в течение 24 ч при встряхивании. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин и отбирали супернатант. Полученные супернатанты и сыворотки хранили при температуре -70°C.

Определение концентрации свободных цитокинов осуществляли с использованием наборов реагентов для ИФА фирмы «Вектор Бест», РФ, в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ осуществляли с использованием непараметрических критериев, определяя медиану и размах 25-го и 75-го квартилей данных в группах больных и здоровых доноров.

Сравнение показателей 2 групп проводили, используя U-критерий Манна-Уитни. Достоверными считали различия показателей концентрации цитокинов при P<0,05.

Результаты и обсуждение

Исследования цитокинового профиля сыворотки крови больных бронхиальной астмой в период обострения позволили выявить достоверное повышение концентраций как провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ФНОα, ИЛ-6 (P равен 0,003; 0,011; 0,011 соответственно), так и противовоспалительного ИЛ-4 (P=0,038), а также амбивалентного ИЛ-17 (P=0,025); при этом в крови здоровых доноров отме-

чались только следовые недетектируемые количества провоспалительных цитокинов, тогда как у больных концентрация соответствующих медиаторов повышалась до 74–94 пг/мл (рис. 1).

Для оценки цитокининдуцирующей активности проводился сравнительный анализ концентрации цитокинов в среде инкубации иммунокомпетентных клеток крови больных бронхиальной астмой и здоровых доноров.

Как показано на рис. 2, спонтанная продукция клетками крови больных бронхиальной астмой в стадии обострения провоспалительных цитокинов ИНФγ и ИЛ-1β превышала соответствующие показатели в контрольной группе (P=0,006 и 0,045 соответственно).

Для оценки потенциала белоксинтезирующей активности проводили сравнительный анализ стимулированной продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками крови больных бронхиальной астмой и здоровых доноров.

Представленные на рис. 3 результаты свидетельствуют о повышенной продукции провоспалительных цитокинов клетками крови больных бронхиальной астмой в стадии обострения после их стимуляции *in vitro*.

При этом было отмечено достоверное увеличение синтеза ИЛ-6 (P=0,03) и ИЛ-1β (P=0,016) у больных бронхиальной астмой.

Проведенный сравнительный анализ спонтанной и стимулированной цитокининдуцирующей активности выявил достоверные отличия в продукции только ИЛ-6 (P=0,001), ИЛ-1 β (P=0,018) и ИЛ-10 (P=0,050) интактными и стимулированными иммунокомпетентными клетками крови больных бронхиальной астмой.

В то время как у здоровых доноров стимуляция клеток использованным нами способом приводила к достоверному росту продукции широкого спектра про- и противовоспалительных цитокинов ИНФ-γ (P=0,025), ФНО-α (P=0,014), ИЛ-6 (P=0,044), ИЛ-1β (P=0,042), ИЛ-8 (P=0,048), ИЛ-4 (P=0,037) и ИЛ-17 (P=0,014).

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что у больных бронхиальной астмой в стадии обострения отмечаются повышенные концентрации в крови, как про- так и противовоспалительных цитокинов.

Данные изменения цитокинового профиля сопровождается увеличением спонтанной продукции медиаторов воспаления. При этом следует отметить, что стимуляция синтеза и секреции цитокинов у больных бронхиальной астмой, в отличие от здоровых доноров не всегда приводит к повышению их индуцированной продукции.

Эти различия, очевидно, обусловлены, исходной стимуляцией лейкоцитов крови больных бронхиальной астмы за счет избыточной продукции эндогенных медиаторов воспаления.

Следовательно, представленные результаты не позволяют однозначно говорить о поляризации иммунного ответа у больных бронхиальной астмой по Th1- или Th2-типу, поскольку отмечается увеличение как про- так противовоспалительных цитокинов. Это может быть связано с тем, что при бронхиальной астме в стадии обострения аллергические реакции развиваются на фоне или сопровождаются инфекционными процессами.

Поэтому, может наблюдаться одновременная экспрессия Th1 – цитокинов, участвующих в механизмах воспаления и Th2 – медиаторов, ответственных за формирование аллергических реакций.

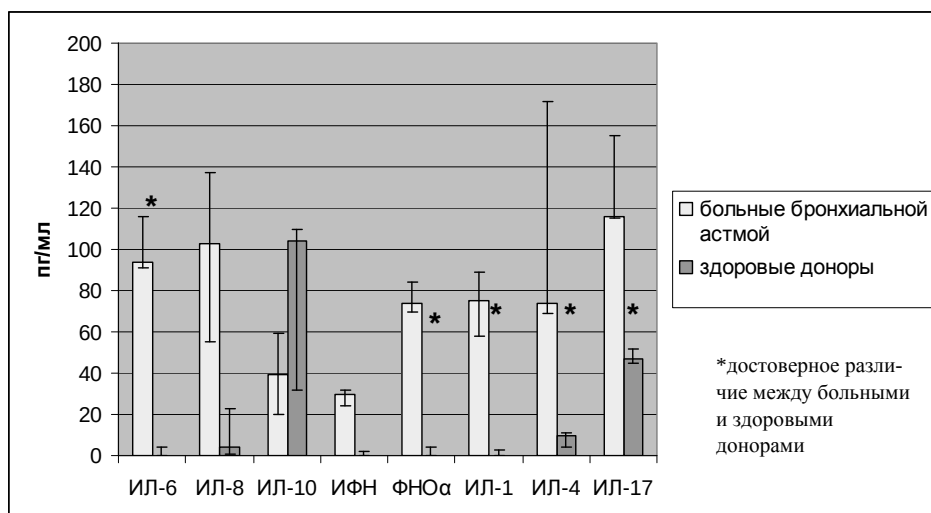


Рис. 1. Концентрация цитокинов в сыворотке крови больных бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми донорами.

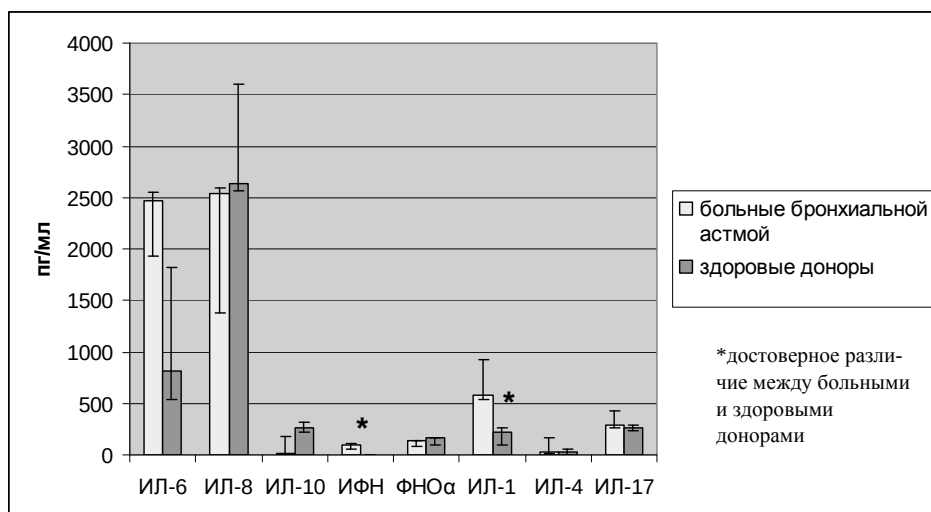


Рис. 2. Спонтанная продукция цитокинов клетками крови больных бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми донорами.

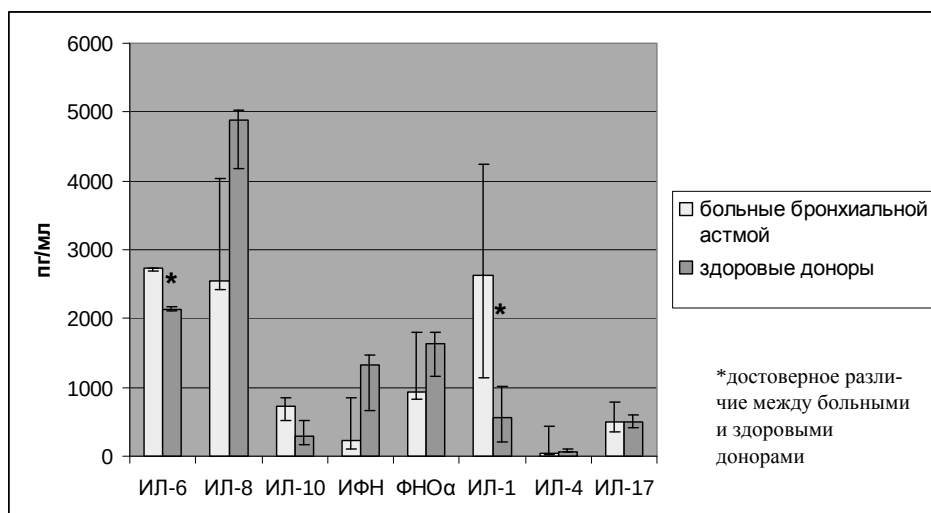


Рис. 3. Индуцированная продукция цитокинов клетками крови больных бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми донорами.

Кроме того, следует учитывать амбивалентный характер действия некоторых цитокинов. В частности, ИЛ-6, являясь провоспалительным медиатором, способен индуцировать Th2-дифференцировку CD4⁺ Т-лимфоцитов и способствует генерации супрессорных Th17-клеток [8].

В свою очередь ИЛ-17, продуцируемый упомянутыми выше Th17-лимфоцитами, усиливает воспаление, индуцируя ИЛ-6, ФНО-α и других белков острой фазы [11; 13].

Вышеизложенное свидетельствует о целесообразности дальнейшего изучения особенностей цитокинового статуса у больных бронхиальной астмой. Эти материалы могут быть использованы для уточнения механизма развития астматических состояний и коррекции лечения в соответствии с преобладанием аллергического или инфекционного компонента у конкретного пациента, а также для разработки перспективных стратегий антицитокиновой терапии бронхиальной астмы.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ (грант НШ-3482.2010.7).

Литература

1. Barnes P.J., Chung K.F., Page C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update // *Pharmacol. Rev.* – 1998. – 50. – P. 515–96.
2. Barnes P.J. Novel approaches and targets for treatment of chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1999. – 160. – S72–S79.
3. Bi Y., Liu G., Yang R. Th17 cell induction and immune regulatory effects // *J. Cell Physiol.* – 2007. – 211. – 273–8.
4. Borish L.C., Nelson H.S., Lanz M.J. et al. Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1999. – 160. – P. 1816–23.
5. Boyton R.J., Altamann D.M. Asthma: New developments in cytokine regulation // *Clin. Exp. Immunol.* – 2004. – 136. – P. 13–4.
6. Chung K.F., Barnes P.J. Cytokines in asthma // *Thorax.* – 1999. – 54. – P. 825–57.
7. Greenfeder S., Umland S.P., Cuss F.M. et al. Th2 cytokines and asthma - The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease // *Respiratory Research.* – 2001. – 2. – P. 71–9.
8. Kamimura D., Ishihara K., Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model // *Rev. Physiol. Biochem. and Pharmacol.* – 2003. – 149. – P. 1–38.
9. Kips J.C., O'Connor B.J., Langley S.J. et al. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2003. – 167(12). – P. 1655–9.
10. Leckie M.J., Brincke A., Khan J. et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response // *Lancet.* – 2000. – 356. – P. 2144–8.
11. Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage // *Nature.* – 2006. – 441(7090). – P. 231–4.
12. Palmer L.J., Cookson W. Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma // *Respir. Research.* – 2001. – 2. – P. 102–12.
13. Park S.J., Lee Y.C. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma // *Respir. Res.* – 2010. – 11. – P. 78–88.
14. Steinke J.W., Borish L. Th2 cytokines and asthma - Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists // *Respiratory Research.* – 2001. – 2. – P. 66–70.
15. Wills-Karp M. The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits // *Respiratory Research.* – 2000. – 1. – P. 19–23.
16. Zhou Y., McLane M., Levitt R.C. Th2 cytokines and asthma - Interleukin-9 as a therapeutic target for asthma // *Respiratory Research.* – 2001. – 2. – P. 80–4.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.5-006.81:616.16-092.4

*И.Н. Григорьева, О.С. Бурова, Е.В. Степанова, Т.К. Харатишвили, А.Ю. Барышников***СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ К ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Григорьева Ирина Николаевна, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-10-65;**e-mail:** i.n.grigorieva@gmail.com

Статья поступила: 10.09.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Целью данной работы являлось изучение способности клеточных линий метастатической меланомы кожи к васкулогенной мимикрии (ВМ) *in vitro* и *in vivo*. Опухолевые клетки, выделенные из различных метастатических меланом кожи, проявляли свойства эндотелиальных клеток (ЭК): они были способны воспроизводить *in vitro* их функциональные свойства (формировать сосудисто-подобные структуры) и экспрессировать характерные для них маркеры. Способность к ВМ также сохранялась при имплантации опухолевых клеток иммунодефицитным мышам. Проявленные свойства позволяют использовать клеточную линию метастатической меланомы кожи человека *mel Cher* в качестве положительной модели для изучения механизмов ВМ и скрининга противоопухолевых препаратов, способных ее блокировать *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: васкулогенная мимикрия, меланома кожи, экспериментальные модели.*I.N. Grigorieva, O.S. Burova, E.V. Stepanova, T.K. Kharatishvili, A.Yu. Baryshnikov***ABILITY OF METASTATIC CUTANEOUS MELANOMA CELL LINES TO VASCULOGENIC MIMICRY***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

We have studied the ability of metastatic cutaneous melanoma cell lines to vasculogenic mimicry (VM) *in vitro* and *in vivo*. Our results showed that metastatic cutaneous melanoma cell lines could mimic endothelial cells behavior, form vessel-like structures and express endothelial cells markers. The presence of VM-structures was also shown for tumor cells implants in nude mice. Mel Cher metastatic cutaneous melanoma cell line could be used as the positive tumor model of vasculogenic mimicry. It is necessary for further studying of VM molecular pathways and cancer screening of VM inhibiting drugs *in vitro* and *in vivo*.

Key words: vasculogenic mimicry, cutaneous melanoma, experimental models.**Введение**

В настоящее время идут активные исследования в области создания новых противоопухолевых средств с направленным механизмом действия (таргетных препаратов [3]). Отличительной особенностью таких лекарств является воздействие на определенный механизм прогрессии злокачественных опухолей через блокирование белка-мишени в опухолевых клетках.

После работ Фолкмана и Ауспрунка 1970 г., посвященных кровоснабжению опухолей, было введено определение ангиогенеза опухоли как формирования новых микрососудов из предсуществующих в ткани капилляров [9]. С того самого времени начались исследования по поиску новых антиангиогенных противоопухолевых препаратов. Данный класс препаратов блокирует образование новых сосудов в опухоли и «нормализует» уже сформированную кровеносную сеть внутри опухолевой ткани [7]. В настоящее время в клинической практике используется Авастин (МКА к VEGF), Сутент (синтетический ингибитор тирозинкиназных рецепторов VEGFR, PDGFR, c-KIT, RET, FLT3) и другие. Антиангиогенная терапия в сочетании с химиотерапией увеличивает эффективность лечения на 15–25% [14].

Однако исследования последних лет показывают, что ангиогенез не является единственным механизмом кровоснабжения опухоли [4]. ВМ – это способность высокоагрессивных опухолевых клеток образовывать без участия эндотелиальных клеток и фибробластов каналы, ограниченные базальной мембраной, по которым может осуществляться кровоток [4]. Этот новый тип васкуляризации опухоли был открыт сравнительно недавно – в 1999 году [6; 12], и некоторые исследователи сомневаются в существовании этого процесса [13]. Наличие ВМ в ткани опухоли рассматривается как неблагоприятный фактор прогноза течения некоторых типов злокачественных опухолей. Выявлена высокая корреляция между способностью к ВМ и частотой метастазирования первичных меланом кожи и глаз [19].

Предполагается, что одним из возможных механизмов резистентности к антиангиогенной терапии может быть появление компонента ВМ. Так, в экспериментах *in vivo* было показано, что при длительном введении ангиостатина, природного ингибитора ангиогенеза, у некоторых мышей возникла резистентность к проводимому лечению [8]. Гистологический анализ образцов опухолей, нечувствительных к действию препарата, показал, что в этих опухолях, в отличие от чувствительных, присутствует компонент ВМ.

В связи с этим необходимость изучения механизмов данного процесса и создание нового направления лечения опухолей, направленного не ее блокирование, являются актуальными.

Целью настоящей работы являлось определение способности клеточных линий метастатической меланомы кожи человека к васкулогенной мимикрии *in vitro* и *in vivo*. Также наряду с процессом ВМ была изучена экспрессия различными клеточными линиями меланомы молекулярно-биологических маркеров, характерных для ЭК.

Материалы и методы

Исследование проводилось на клеточных линиях метастатической меланомы кожи, полученных от пациентов, находившихся на лечении в НИИ КО: mel Cher, mel P, mel Mtp, mel Ibr, mel Ksen, mel Kor, mel Gus, mel R, mel Me, mel Ch, mel П, mel Мl, mel Si, mel BGF, mel RZ84 [2]. Клеточные линии культивировались во флаконах (Costar) объемом 25 см³ в среде RPMI-1640, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 1 пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл).

Формирование сосудисто-подобных структур *in vitro*

Формирование сосудисто-подобных структур (СПС) оценивалось при инкубации опухолевых клеток на матриксе базальных мембран Матригеле (BD Bioscience). Холодный Матригель наносился на дно лунок 48-луночного планшета, полимеризация геля проводилась при 37 °С в течение 20 минут. Клетки наносились в количестве 100 000 на лунку в полной среде RPMI-1640. Результаты оценивались через 16 и 24 ч. Эксперименты повторялись не менее 3 раз в дуплетах.

Формирование тубулярных структур *in vitro*

Формирование тубулярных структур оценивалось при инкубации опухолевых клеток на матриксе базальных мембран Матригеле (BD Bioscience) или фибронектине (BD Bioscience). На покровные стекла 24×24 мм наносился холодный Матригель или фибронектин согласно инструкции. После полимеризации матрикса опухолевые клетки наносили в количестве 500 000. Результаты оценивали на каждый 3 день. Эксперименты повторялись не менее 3 раз в дуплетах.

Иммуноцитохимическое исследование

Иммуноцитохимическое исследование проводилось на опухолевых клетках линий mel Cher, mel Ch, mel P, mel Mtp, mel Kor, mel Me, mel Ibr, выращенных на предметных стеклах. При достижении 70–80 % монослоя стекла промывались в фосфатно-солевом буфере и фиксировались в холодном спирте (5 мин) и ацетоне (3 мин).

Инкубацию с антителами проводили в течение 18 ч при 4 °С. Для визуализации реакции антиген-антитело использовали стрептавидин-биотиновую тест-систему LSAB+kit (фирма DAKO). Хромогеном служил DAB (фирма DAKO).

Ядра клеток докрашивали гематоксилином и заключали под покровное стекло.

В качестве первичных антител использовали МКА к VEGF (клон VG1, DAKO; разведение 1 : 25), VEGFR-1 (клон Rb-1527p, Neomarkers; разведение 1 : 250), VEGFR-2 (клон Rb-1526p, Neomarkers; разведе-

ние 1 : 250), CD31 (клон 7C70A, DAKO; разведение 1 : 50), von Willebrand factor (поликлональные, DAKO; разведение 1 : 200), ламинин (клон 4C7, DAKO, разведение 1 : 1000), 5 α 2 цепь ламинина (клон 4G1, DAKO; разведение 1 : 50), Эфрин A2 (клон H-175, Santa Cruz Biotechnology; разведение 1 : 400), c-met (клон EP1454Y, Abcam; разведение 1 : 250), Notch3 (поликлональные, Abcam; разведение 1 : 50), коллаген IV типа (клон CIV22, DAKO; разведение 1 : 50), CD133 (поликлональные, Abcam; разведение 1 : 100), Cox-2 (клон CX-294, DAKO, разведение 1 : 100), Ki-67 (клон MIB-1, DAKO; разведение 1 : 100), CD34 (клон QBE10, DAKO; разведение 1 : 50), VE-кадхерин (клон BV9, Abcam; разведение 1 : 50), PTEN (поликлональные, VECTOR; разведение 1 : 500).

Результаты иммуноцитохимической реакции оценивали под световым микроскопом NIKON H550L с использованием оптического увеличения $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$.

Имплантация опухолевых клеток иммунодефицитным мышам *in vivo*

Клетки метастатической меланомы кожи mel Cher перевивались иммунодефицитным мышам Balb/c nude подкожно в количестве 5 000 000 клеток на мыш. Динамика роста перевиваемых опухолей оценивалась каждые 3 дня, начиная с 7 дня после перевивки. Размеры опухоли определяли как отношение ширины к длине и на половину ширины. Наблюдение за мышами осуществлялось 25 дней после перевивки. После окончания эксперимента опухоли удалялись для дальнейшего исследования.

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование образцов опухоли

Удаленные опухоли фиксировались в 10 %-ном нейтральном формалине и заключались в парафин. Срезы опухолей окрашивались гематоксилином и эозином для рутинного морфологического исследования. Иммуногистохимическое исследование включало окрашивание срезов опухоли на наличие кровеносных сосудов и опухолевых каналов.

Наличие опухолевых каналов оценивалось по окрашиванию реактивом Шиффа (на базальные мембраны). Использовался набор Accustain для PAS окрашивания (Sigma Aldrich). Срезы инкубировали в периодической кислоте в течение 10 мин при комнатной температуре, промывались дистиллированной водой, а затем – в основании Шиффа в течение 15 мин, далее промывались проточной водой и заключались под покровное стекло. Окрашивание на кровеносные сосуды проводили с использованием антител против CD34-антигена (клон CBR-E8, Santa Cruz Biotechnology; разведение 1 : 50). Инкубацию с антителами проводили в течение 18 ч при температуре 4 °С. Для визуализации реакции антиген-антитело использовали поликлональные антитела против крысиных иммуноглобулинов, меченные биотином (фирма BD Bioscience, разведение 1:100) и стрептавидин-HRP (фирма DAKO). Хромогеном служил DAB (фирма DAKO). Затем срезы либо окрашивали реактивом Шиффа согласно методике, описанной выше, без докрашивания гематоксилином. Срезы заключались под покровное стекло.

Результаты и обсуждение

Нами была исследована способность 15 клеточных линий метастатической меланомы кожи человека, прошедших более 30 пассажей, к формированию СПС.

Культивирование клеток в низкой плотности на Матригель приводило к формированию СПС через 10–16 ч. 80 % изученных клеточных линий метастатической меланомы кожи обладали воспроизводимой способностью к формированию СПС при инкубации на Матригеле *in vitro*. В этом случае опухолевые клетки, посаженные на Матригель, образовывали длинные, соединенные друг с другом трубочки, отсутствовали незамкнутые трубочки, не ограниченные контактами с другими (рис. 1а). Наблюдаемые СПС были похожи на структуры, формируемые клеточной линией эндотелиальных клеток SVEC-4-10 (рис. 1б). 6 (40 %) из 15 клеточных линий (mel Cher, mel Ch, mel R, mel BGF, mel Si, mel P) образовывали стабильные СПС, которые сохранялись не менее 24 ч. 6 (40 %) клеточных линий (mel Il, mel Kor, mel Mtp, mel Ml, mel Gus, mel RZ84) формировали нестабильные СПС, которые разрушались через 20–24 ч инкубации клеток на Матригеле (рис. 1в). 3 (20 %) изученные клеточные линии (mel Ksen, mel Ibr, mel Me) обладали низкой способностью к формированию СПС. В этом случае образование СПС не воспроизводилось от опыта к опыту и часто зависело от наличия/отсутствия монослоя культуры клеток, взятых для эксперимента. При этом опухолевые клетки, не формирующие СПС, образовывали малые кластеры клеток с короткими прерывающимися трубочками (рис. 1г).

При длительном исследовании (2–3 нед.) опухолевые клетки линии mel Cher формировали тубулярные структуры. В этом случае клетки высаживались в высокой плотности на Матригель или фибронектин. Формирование тубулярных структур началось спустя 3 дня после начала культивирования клеток и завершалось к концу 2 недели. При этом на монослое клеток были видны поверхностные объемные петли, окружающие небольшие кластеры опухолевых клеток, и сети, состоящие не менее чем из 3 петель, соединенных вместе (рис. 2а). Клеточная линия mel Me не была способна формировать тубулярные структуры при инкубации на Матригеле или фибронектине (рис. 2б).

Способность к ВМ сохранялась также при введении опухолевых клеток клеточной линии mel Cher подкожно мышам с иммунодефицитом *in vivo*. При введении 5 000 000 клеток, выращенных в культуре *in vitro*, подкожные узлы появились на 5 день. К 25 дню средний объем опухоли составил 180 мм³ (рис. 3). Морфологический и иммуногистохимический анализ проводился на срезах опухолей, полученных на 25 день после перевивки. При гистологическом исследовании опухоль состояла из пласта средних, полиморфных клеток, разделенных узкими прослойками соединительной ткани. В некоторых опухолевых клетках наблюдалось наличие небольшого количества пигмента (меланина). Ядра опухолевых клеток овально-округлой формы. Имеются немногочисленные сосуды. Среднее количество CD34+ сосудов в опухоли было равно 8±2. Окрашивание срезов опухолей реактивом Шиффа на наличие базальных мембран показало, что в ткани опухоли присутствовали PAS+ структуры в виде параллельных, параллельных с пересечением каналов и арок. Комбинированное окрашивание на маркер CD34 и наличие базальных мембран показало, что PAS+ структуры не окрашивались антителами к CD34 и ограничены опухолевыми клетками, что является признаком ВМ (рис. 4).

На 7 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека проводилось иммуноцитохимическое исследование экспрессии молекулярно-

биологических маркеров, характерных для эндотелиальных клеток или определяющих способность опухолевых клеток к ВМ.

В опухолевых клетках (100 % случаев) наблюдалась высокая экспрессия комплекса von Willebrand factor/VIII фактор, характерного для эндотелиальных клеток. Экспрессия CD31 обнаружена в 29 % (2), а CD34 – в 43 % (3) случаев.

Наблюдалась высокая экспрессия белков VEGF рецептор-лигандной системы: VEGF – в 57 % (4) случаях, VEGFR-1 (Flt-1) – в 100 % (7) и VEGFR-2 (Flk-2/KDR) – в 100 % (7) случаев. Антителами к данным маркерам окрашивались цитоплазма (VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2) и мембрана (VEGFR-1 и VEGFR-2) опухолевых клеток с высокой или средней интенсивностью. Однако анализ фосфорилирования VEGFR-2, рецептора с высокой тирозинкиназной активностью, в опухолевых клетках 3 линий (mel Ch, mel Kor, mel P) не выявил киназной активности данного рецептора. Отсутствовало окрашивание антителами к VEGFR-2, фосфорилированному по Тут 951 (основной сайт аутофосфорилирования для VEGFR-связывающих белков) и Тут1175 (основной сайт аутофосфорилирования для VEGFa) доменам [18; 20].

Изучалась также экспрессия основных белков базальных мембран, которые ограничивают кровеносные сосуды и опухолевые каналы. 5 (71 %) опухолевых линий синтезировали коллаген IV типа и 5 (71 %) – 5γ2 цепь ламинина. Окрашивание наблюдалось в цитоплазме опухолевых клеток.

Экспрессия молекулярно-биологических маркеров, ассоциированных с агрессивностью течения болезни и способностью к ВМ, представлена на примере клеточной линии метастатической меланомы кожи mel Cher в табл.

Все культуры эндотелиальных клеток различного происхождения способны формировать трубочки при инкубации на соответствующем компоненте внеклеточного матрикса. Способность формировать СПС является автономным свойством ЭК, т.е. клетки нуждаются во внеклеточных сигналах, разрешающих начать формирование трубочек, но не в сигналах, контролирующих этапы этого процесса [10]. В настоящее время для оценки формирования СПС используется Матригель – природный матрикс базальных мембран, экстрагированный из саркомы EHS mouse sarcoma мыши. Основным его компонентами являются ламинин, коллаген IV, протеингликаны, энтактин и нидоген [5]. Он также содержит факторы роста – трансформирующий фактор роста β, факторы роста фибробластов, тканевый активатор плазминогена и другие. Использование Матригеля значительно ускоряет морфологическую дифференцировку ЭК в СПС, которые практически идентичны капиллярной сети, наблюдаемой *in vivo* [15]. Клетки увеальной меланомы [7], а также некоторые клеточные линии молочной железы и яичников [4] в аналогичных условиях оказались способными к формированию подобных структур. В нашем исследовании 80 % исследованных клеточных линий метастатической меланомы кожи при инкубации на Матригеле также формировали СПС, характерные для ЭК. Рисунок сосудистоподобных структур, образуемый такими клеточными линиями, повторяет структурированную сеть, которую можно наблюдать в ткани опухолей человека. Также введение клеток mel Cher мышам с иммунодефицитом приводило к формированию опухолей, имеющих признаки ВМ: наличие PAS-положительных структур, не окрашенных антителами к маркеру эндотелиальных клеток CD34.

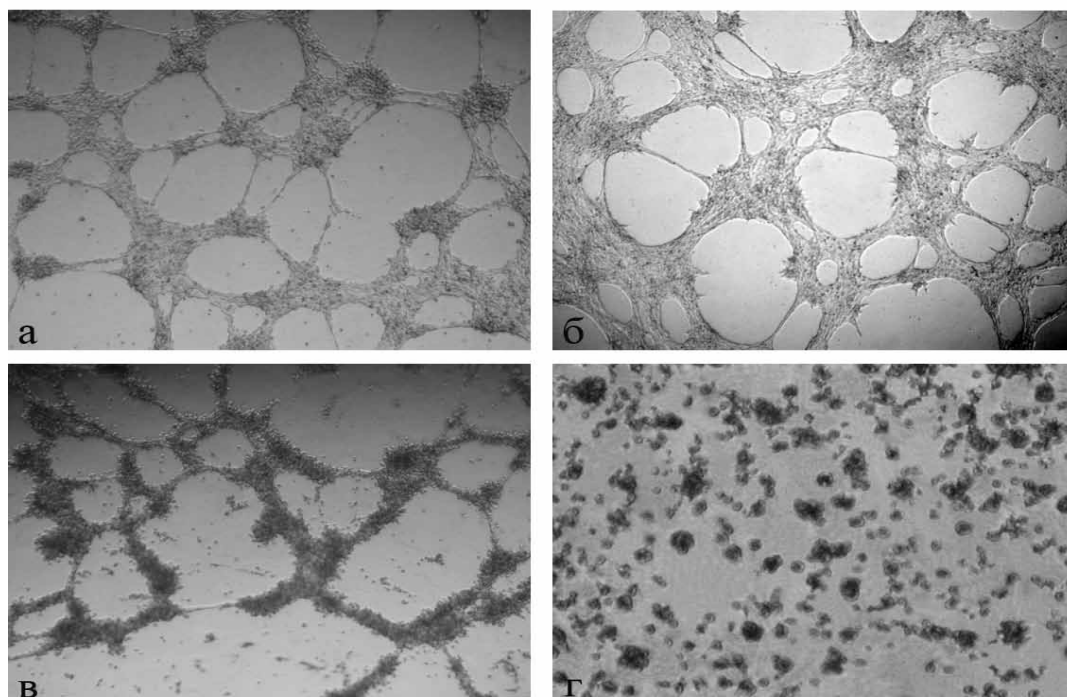


Рис. 1. Культивирование клеток в низкой плотности на Матригель (оптическое увеличение $\times 25$).

- (а) – формирование СПС клетками mel Cher,
- (б) – эндотелиальными клетками линии SVEC-4-10;
- (в) – разрушение СПС, сформированных клетками mel Me через 20 ч инкубации на Матригеле;
- (г) – формирование кластеров клеток клеточной линией mel Ksen.

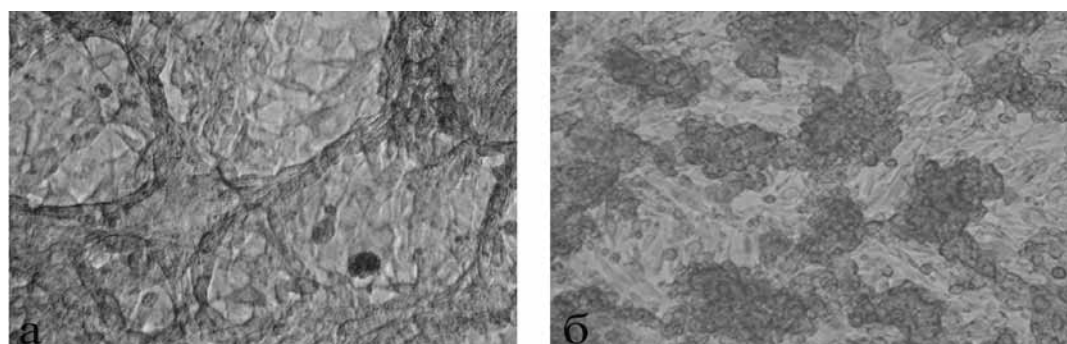


Рис. 2. Культивирование клеток в высокой плотности на Матригель (оптическое увеличение $\times 25$).

- (а) – формирование тубулярных структур клеточной линией mel Cher;
- (б) – отсутствие формирования клеточной линией mel Me тубулярных структур;

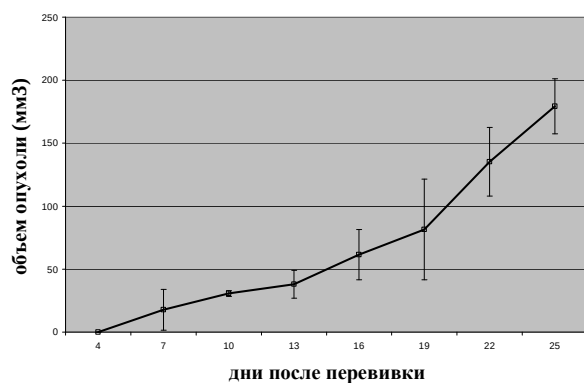


Рис. 3. Динамика роста подкожных ксенографтов клеточной линии метастатической меланомы кожи человека mel Cher.

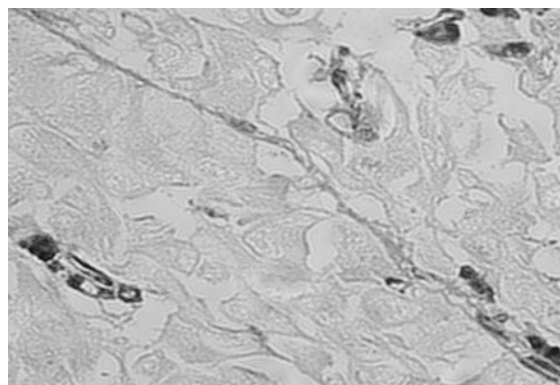


Рис. 4. CD34-/PAS+-структуры в ткани имплантированной опухоли mel Cher. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер эндотелиальных клеток CD34 (хромоген DAB), последующее PAS-окрашивание без докрасивания гематоксилином, увеличение $\times 200$.

Таблица

Экспрессия молекулярно-биологических маркеров клетками линии Mel Cher, определенная иммуноцитохимическим методом

Белок	Характеристика экспрессии на опухолевых клетках
<i>VEGF рецептор-лигандная система</i>	
VEGF	Окрашивается мембрана и цитоплазма 100 % опухолевых клеток с высокой интенсивностью
VEGFR-1(Flt-1)	Окрашивается мембрана, цитоплазма и ядра 90–100 % опухолевых клеток с высокой интенсивностью
VEGFR-2(Flk-1/KDR)	Окрашивается мембрана, цитоплазма и ядра 80 % опухолевых клеток с высокой интенсивностью
<i>Маркеры эндотелиальных клеток</i>	
Комплекс фактор Виллебранда/фактор VIII	Окрашивается мембрана и цитоплазма 100 % опухолевых клеток с высокой интенсивностью
CD31	Отсутствует
CD34	Отсутствует
<i>Белки базальных мембран</i>	
Ламинин	Окрашивается мембрана и цитоплазма 70 % опухолевых клеток со средней интенсивностью
5γ2 цепь ламинина	Окрашивается мембрана и цитоплазма 90 % опухолевых клеток со средней интенсивностью
Коллаген IV типа	Окрашивается цитоплазма 60 % опухолевых клеток с низкой интенсивностью
<i>Другие маркеры ангиогенеза</i>	
Эфрин A2	Окрашивается цитоплазма 100 % опухолевых клеток со средней интенсивностью
VE-кадхерин	Окрашивается цитоплазма 100 % опухолевых клеток со средней интенсивностью
Cox-2	Окрашивается цитоплазма 30 % опухолевых клеток со слабой интенсивностью
<i>Маркеры дифференцировки опухолевых клеток</i>	
c-met	Окрашивается цитоплазма 60–70 % опухолевых клеток с высокой интенсивностью
NOTCH3	Окрашивается цитоплазма 80 % опухолевых клеток с высокой интенсивностью
CD133	Окрашивается цитоплазма 95 % опухолевых клеток с высокой интенсивностью
<i>Другие молекулярно-биологические маркеры агрессивности опухоли</i>	
Ki-67	Индекс пролиферативной активности – 70 %.
PTEN	Отсутствует

Как показано, формирование сосудисто-подобных и тубулярных структур коррелирует с экспрессией некоторых белков [11; 16; 17; 21]. Поскольку клетки высокоагрессивных меланом возвращаются в плюрипотентный, эмбриональный фенотип, то они могут нести на своей поверхности маркеры фибробластов, эндотелиальных, гемопоэтических и некоторых других клеток.

Считается, что клеточные линии, способные к ВМ, активно продуцируют маркеры эндотелиальных клеток (VE-кадхерин, ламинины, эфрины, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, фактор Виллебранда), дифференцировочные белки (c-met, NOTCH) и другие. В нашем исследовании показано, что хотя белки VEGF рецептор-лигандной системы гиперэкспрессируются на клеточных линиях, обладающих способностью к ВМ, при инкубации клеток на стекле они не активны (отсутствует фосфорилирование VEGFR-2 рецептора по Tyr 951 и Tyr 1175).

Обнаружена также высокая экспрессия белков базальных мембран и комплекса фактор Виллебранда/VIII фактор, что соответствует данным литературы [12].

Таким образом, 6 клеточных линий метастатической меланомы кожи обладают способностью к формированию стабильных сосудистоподобных структур. Они проявляют свойства эндотелиальных

клеток: они способны воспроизводить *in vitro* их функциональные свойства (формировать СПС) и экспрессировать характерные для них маркеры.

Клеточная линия mel Cher обладает способностью к образованию СПС и тубулярных структур *in vitro* и формирует опухолевые каналы при подкожном введении мышам *in vivo*.

Данная клеточная линия метастатической меланомы может быть использована в качестве

модели для изучения механизмов ВМ и скрининга противоопухолевых препаратов, способных блокировать ВМ *in vitro* и *in vivo* [1].

Заключение

Васкулогенная мимикрия – это сложный процесс, который требует дальнейших исследований механизмов его формирования и блокирования. Клеточные линии метастатической меланомы кожи в большинстве случаев обладают хорошей способностью к ВМ.

Использование клеточных линий метастатической меланомы кожи, характеризующихся высокой способностью к ВМ, может помочь в поиске противоопухолевых препаратов, способных блокировать данный процесс.

Литература

1. Григорьева И.Н., Степанова Е.В., Вартамян А.А. и др. Применение клеточной линии меланомы кожи человека mel Cher в качестве положительной модели вакулогенной мимикрии. – Заявка №2009115731/10(021559), срок действия патента с 27.04.2009.
2. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2005. – Т. 7. – С. 37–40.
3. Семглазов В.Ф., Иванов В.Г., Семглазов В.В. и др. Биологически направленная (таргетная) терапия рака молочной железы // РМЖ. – 2007. – Т. 25. – С. 1912–15.
4. Степанова Е.В., Вартамян А.А., Личиницер М.Р. Васкулярная мимикрия при злокачественных образованиях // Молекулярная медицина. – 2006. – Т. 1. – С. 23–30.
5. Baatout S. Endothelial differentiation using Matrigel // *Anticancer Res.* – 1997. – 17. – P. 451–5.
6. Bissell M.J. Tumor plasticity allows vasculogenic mimicry, a novel form of angiogenic switch—a rose by any other name? // *Am. J. Pathol.* – 1999. – 155. – P. 675–9.
7. Chistofalli M., Charnsangavej C., Hortobagyi G.N. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches // *Nature Reviews*. – 2002. – 1. – P. 415–26.
8. Cirone P., Bourgeois J.M., Chang P.L. Antiangiogenic cancer therapy with microencapsulated cells // *Hum. Gene Ther.* – 2003. – 14(11). – P. 1065–77.
9. Ellis E.M. Tumor angiogenesis // *Horizons in cancer research*. – 2002. – 1. – P. 4–22.
10. Folkman J., Haudenschild C. Angiogenesis in vitro // *Nature*. – 1980. – 288. – P. 551–6.
11. Harold-Mende C., Steiner H.H., Andl I. Expression and functional significance of VEGF receptors in human tumor // *Lab. Invest.* – 1996. – 79. – P. 1573–82.
12. Maniotis A., Folberg R., Hess A. et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry // *Am. J. Pathol.* – 1999. – 55. – P. 739–52.
13. McDonald D.M., Munn L., Jain R.K. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? // *Am. J. Pathol.* – 2000. – 156. – P. 383–8.
14. Miller K.D., Sweeney S.J., Sledge G.W. The Snark is a Boojum: the continuing problem of drug resistance in the antiangiogenic era // *Annals of Oncology*. – 2003. – 14. – P. 20–8.
15. Risau W., Flamme I. Vasculogenesis // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 1995. – 11. – P. 73–91.
16. Rybak Susanna M., Sanovich Elena, Hollingshead Melinda G. et al. “Vasocrine” Formation of Tumor Cell-lined Vascular Spaces: Implications for Rational Design of Antiangiogenic Therapies // *Cancer Research*. – 2003. – 63. – P. 2812–9.
17. Stupac D.G., Cherash D.A. Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis // *Oncogene*. – 2003. – 22. – P. 9022–9.
18. Takahashi T., Yamaguchi S., Chida K., Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-g and DNA synthesis in vascular endothelial cells // *EMBO J.* – 2001. – 20. – P. 2768–78.
19. Warso M.A., Maniotis A.J., Chen X. et al. Prognostic significance of periodic acid-schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – 7. – P. 473–7.
20. Wu L.W., Mayo L.D., Dunbar J.D. et al. VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor // *J. Biol. Chem.* – 2000 – 275 – P. 6059–62.
21. Yayun Liang, Rolf A. Brekken, Salman M. Hyder. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones // *Endocrine-Related Cancer*. – 2006. – 13. – P. 905–19.

УДК 616-006.81-036:615.373:577.112

Н.В. Голубцова¹, И.Н. Михайлова¹, В.В. Новиков², К.А. Парсункова³, И.В. Самойленко¹,
Н.Н. Петенко¹, Е.В. Огородникова¹, В.Н. Тазаев¹, Е.А. Черемушкин¹, К.А. Барышников¹,
Е.В. Коржевская¹, Н.Б. Преснякова², Г.З. Чкадуа¹, Л.В. Демидов¹, А.Ю. Барышников¹

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ УРОВНЕЙ
РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ HLA I КЛАССА И
АНТИГЕНА CD8 У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ**

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

³ГУП «МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

Контактная информация:

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

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

e-mail: ngolubcova@mail.ru

Статья поступила: 16.09.2010, принята к печати 01.11.2010.

Резюме

Исследовано относительное содержание S-100 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии дендритными клетками. В зависимости от исходных уровней пациенты делились на две группы (с повышенными значениями и пониженными значениями сывоточного уровня S-100) относительно показателей в контрольной группе доноров. Проведенный анализ выживаемости выявил статистически значимые различия в выживаемости больных в зависимости от начального уровня относительного содержания S-100 в образцах сывотки крови пациентов в обеих группах. Медиана выживаемости пациентов с исходно повышенными значениями S-100 составила 22,0±7,8 мес. В группе с пониженными значениями S-100 медиана выживаемости составила 54,0±25,2 мес. (p=0,045). В сывотке крови больных с исходно повышенным уровнем растворимых молекул HLA I класса и пониженным растворимым антигеном CD8 выявлено менее интенсивное повышение уровня S-100, чем у больных с пониженным изначально сывоточным содержанием растворимой формы HLA I и повышенным растворимым CD8, у которых отмечено более значительное повышение сывоточного уровня S-100 в ходе вакцинотерапии дендритными клетками. Изменение сывоточного содержания растворимых молекул HLA I класса и антигена CD8 является прогностически значимым.

Ключевые слова: меланома белок S-100, иммунная система, дендритные клетки, растворимые антигены.

N.V. Golubzsova¹, I.N. Mikhailova¹, V.V. Novicov², K.A. Parsunkova³, I.V. Samoylenko¹,
N.N. Petenko¹, E.V. Ogorodnikova¹, V.N. Tazaev¹, E.A. Cheriomyshkin¹, K.A. Baryshnikov¹,
E.V. Korzhevskaya¹, N.B. Presniakova², G.Z. Chkadua¹, L.V. Demidov¹, A.Yu. Baryshnikov¹

**PROGNOSTIC SIGNIFICANT
OF SOLUBLE MHC I SERUM LEVEL AND CD8 ANTIGEN
IN PATIENTS WITH DISSEMINATED MELANOMA**

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

²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

³«Intermedbiophyschem», Moscow

Abstract

In this study we have estimated the serum level of S-100 marker in patients with disseminated melanoma during dendritic cell vaccination. Before vaccinotherapy, the patients were divided into two subgroups with high and low level of S-100 marker in compare with healthy donors. Median survival of patients with high level of S-100 marker were 22,0±7,8 months, whereas in group with low level of S-100 marker median survival were 54±25,2 months (p=0,045). We have observed that S-100 marker level increased in less degree in seum of patients with initial high level of soluble MHC I class molecule and high level of soluble CD8 during dendritic cell vaccination. The data obtained indicate that the alteration in MHC I class molecule and CD8 antigen level in patents with disseminated melanoma treated with dendritic vaccine could be considered of prognostic significance.

Key words: melanoma, S-100, immune system, dendritic cells.

Введение

Клетки иммунной системы характеризуются большим разнообразием поверхностных антигенов, экспрессирующихся на разных этапах гемопоэза и характеризующих направление дифференцировки. Поверхностные антигены являются маркерами различных клеточных популяций. Тридцать лет назад было обнаружено, что у белков, присутствующих на мембране клеток иммунной системы, могут быть

растворимые гомологи. Последние обнаруживаются в биологических жидкостях, в том числе – в крови в разных концентрациях [9; 11].

Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы образуются путем шеддинга (протеолитическое отщепление с мембраны клетки) или альтернативного сплайсинга матричной РНК, приводящего к образованию укороченного транскрипта, соответствующего растворимой форме мембранного антигена.

Растворимые формы мембранных антигенов участвуют в регуляции иммунологических механизмов на разных этапах реализации иммунного ответа [2; 11]. Они выступают в роли межклеточных коммуникаторов, связываясь с лигандами мембранных гомологов на поверхности клеток. В норме растворимые формы мембранных антигенов находятся в равновесном состоянии. Изменения их концентрации в крови и других биологических жидкостях организма обнаружены при различных нарушениях гомеостаза, что отражает активность патологических процессов, протекающих в организме [9; 11]. В настоящее время охарактеризовано более 240 дифференцировочных антигенов лейкоцитов, классифицированных на международных семинарах [10].

Антигены главного комплекса гистосовместимости, как и многие другие мембранные белки клеток иммунной системы, имеют растворимые формы. Экспериментально показано, что растворимые молекулы HLA I класса модулируют реактивность Т-клеток и стимулируют апоптоз *in vitro*. Так, сывороточный HLA I класса может связываться с CD8-молекулами на поверхности цитотоксических Т-клеток, препятствуя распознаванию презентируемых антигенных пептидов и вызывая продукцию растворимого Fas-лиганда. Секретирующийся растворимый Fas-лиганд, выступая в роли аутокринного фактора, способен взаимодействовать с мембранным Fas (CD95) антигеном на этих же клетках с последующей инициацией апоптоза цитотоксических CD8-положительных Т-лимфоцитов. Кроме того, растворимые молекулы HLA I класса способны вызвать апоптотическую гибель натуральных киллеров, которые, подобно CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам, служат важными факторами противоопухолевого иммунитета [7; 9; 11; 16; 17]. Растворимую форму сывороточного HLA-I секретируют *in vivo* как Т- так и В-лимфоциты. Увеличение концентрации сывороточного HLA I происходит в случаях, когда активированы популяции Т-лимфоцитов. Изменение сывороточного уровня растворимых молекул HLA I класса наблюдается в организме человека при различных патологиях. Высокая концентрация растворимых молекул HLA I класса и растворимого Fas-лиганда обнаружены в крови больных ОМЛ [15]. Получены данные о повышении уровня растворимой формы HLA I, CD8-антигена, а также комплекса HLA-I-CD8 при ХМЛ у пациентов, получавших препараты β-интерферона в качестве предшествующей Гливеку™ терапии [7]. Уровень сывороточного HLA I является важным показателем для мониторинга больных после трансплантации костного мозга. Увеличение уровня растворимых молекул HLA I выявлено при остром и хроническом гепатите [11]. Выявлено пониженное по сравнению с нормой содержание сывороточного HLA I у больных инсулинзависимым сахарным диабетом, изменения сывороточного содержания HLA I при инфекционных заболеваниях урогенитального тракта. Изменения в сывороточном уровне HLA I обнаружены при ожоговой и черепно-мозговой травме [11]. Установлено, что развитие рака легкого сопровождается понижением растворимых молекул HLA I класса [1]. Выявлено снижение повышенного сывороточного HLA у больных раком молочной железы на фоне озонотерапии совместно с ПХТ [1]. Уровни молекул HLA I класса повышены у пациентов, страдающих ЛХ и НХЛ. Обнаружено снижение сывороточного HLA I при раке желудка по мере прогрессирования заболевания [11].

Ранее мы показали изменение сывороточно-содержания растворимых молекул HLA I класса и растворимого антигена CD8 у больных диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками [6].

CD8-антиген является поверхностным гликопротеином, найденным на мембране большинства цитотоксических Т-лимфоцитов и части натуральных киллеров. Он обеспечивает эффективное взаимодействие клеток при презентации антигенов цитотоксическим Т-лимфоцитам, является рецептором Т-клеточного рецептора и обеспечивает распознавание антигенов, презентируемых в контексте молекул главного комплекса системы гистосовместимости I класса. Растворимый CD8-антиген продуцируется активированными CD8⁺ цитотоксическими клетками. Сывороточный уровень растворимого CD8-антигена служит маркером активации цитотоксических клеток. В то же время, взаимодействуя с молекулами HLA I класса, он тормозит цитотоксическое действие клеток, препятствуя их активации и пролиферации. Обнаружено повышение растворимого CD8-антигена в сыворотке крови при ВИЧ-инфекции. Повышение сывороточного уровня CD8 отмечено при тяжелой механической травме. Изменения сывороточного уровня растворимого антигена CD8 обнаружены при многих онкогематологических заболеваниях [9; 11].

В мониторинге онкологических больных активно используются онкомаркеры. Определение их уровня до и после проведения операции, в процессе лечения может помочь выявить рецидив, определить прогноз заболевания, ответ на проводимую терапию. Одним из сывороточных маркеров меланомы является недавно описанный опухолеассоциированный антиген S-100 [12; 14; 18]. S-100 белки представляют собой суперсемейство Ca²⁺-связывающих белков, которые обнаружены в клетках различных тканей. Они активно участвуют в процессах клеточного деления, дифференцировки, гомеостаза ионов Ca²⁺, проведении внутриклеточного регуляторного сигнала апоптоза.

Увеличение уровня S-100 в спинномозговой жидкости и плазме является маркером повреждения головного мозга. Рост концентрации белка S-100 в сыворотке крови был обнаружен при глиоме, меланоме, нейробластоме. Установлено, что при меланоме белок S-100 проявляет свойства стадийспецифичности, его средние (по группам) значения растут с уровнем инвазии и размером первичного опухолевого очага [12; 13]. Уровень S-100 также коррелирует с числом пораженных органов, наличием метастазов в печени или кости и ответом на химио- или иммунотерапию.

Целью настоящего исследования явилось изучение корреляции между сывороточным содержанием растворимой молекулы HLA I класса, растворимого антигена CD8 и белка S-100 как маркера прогрессии опухоли в ходе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы сывороток крови больных диссеминированной меланомой (n = 55), полученные до начала вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками и после 5 введения вакцины (интервалы между вакцинациями – 1 мес.). В качестве контроля использовались образцы сывороток крови здоровых доноров (n = 15).

В процессе вакцинотерапии дендритными клетками у всех пациентов был проведен анализ сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса, антигена CD8 и растворимого комплекса HLA-I-CD8 [6].

На основании исходных сывороточных уровней растворимых антигенов, больные диссеминированной меланомой (n=55), получавшие вакцину, были разделены на две ограниченные группы.

Группу 1 составили пациенты с повышенным начальным уровнем растворимых антигенов в сыворотке крови, а группа 2 состояла из больных с исходно пониженным сывороточным уровнем растворимых антигенов [6].

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), нагруженных аутологичным опухолевым лизатом.

Определение сывороточного уровня белка S-100 (S-100 A1B и S-100 BB формы) проводилось иммуноферментным методом с использованием диагностической тест-системы CanAg Diagnostics (Швеция). Учет результатов проводился спектрофотометрически при длине волны 405 нм. Результаты выражали в нг/мл.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием методов описательной статистики.

Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Расчет выживаемости проводили методом Каплан-Майер. Сравнение кривых выживаемости проводили с помощью log-rank критерия, статистический анализ – с помощью пакета программ EXCEL 2003, STATISTICA 6.0 и SPSS 13.0.

Результаты и обсуждение

Перед началом вакцинотерапии среднее значение уровня S-100 в сыворотке крови всех больных диссеминированной меланомой (n=55) составляло $95,66 \pm 74,64$ нг/мл и в ходе лечения достоверно повысилось до $136,83 \pm 139,68$ нг/мл ($p < 0,05$). Среднее значение для S-100 в контрольной группе доноров (n=15) составило $69,40 \pm 9,84$ нг/мл.

Однако значения сывороточного содержания исследуемого антигена у всех пациентов (n=55) колебались от 7,1 до 809,6 нг/мл при нормальных значениях в контрольной группе доноров $69,40 \pm 9,84$ нг/мл. Мы проанализировали полученные результаты и перевели их в относительные в зависимости от нормы (контроль).

В качестве контроля было принято среднее значение исследуемого показателя S-100 в группе здоровых доноров – $69,40 \pm 9,84$ нг/мл. Относительное содержание сывороточного уровня (СУ) маркера S-100 рассчитывали по формуле:

$$СУ = \frac{(\text{опыт} - \text{контроль})}{\text{контроль}} \times 100$$

В зависимости от исходного уровня относительного содержания S-100 в образцах сыворотки крови всех пациентов (n=55) относительно контроля (среднее значение исследуемого показателя в группе здоровых доноров) больные были разделены на 2 группы. Группу 1 составили пациенты с изначально повышенным относительным содержанием исследуемого показателя в сыворотке крови, а группу 2 – больные с пониженным содержанием уровня S-100

относительно средних значений данного маркера в сыворотке крови здоровых доноров (табл. 1).

Анализ относительного содержания S-100 выявил, что исходный уровень маркера у пациентов группы 1 (n=24) был достоверно повышен в 2 раза по сравнению с контролем (здоровые доноры) и достоверно повысился в 3 раза относительно показателей в контрольной группе в ходе лечения.

В образцах сыворотки крови больных группы 2 (31) исходный уровень относительного содержания S-100 был снижен в 1,4 раза в сравнении с контролем и достоверно повысился в 1,1 раза в процессе вакцинотерапии.

Был проведен анализ выживаемости пациентов в этих группах больных (рис. 1). Выявлены статистически значимые различия: медиана выживаемости в группе 1 составила $22,0 \pm 7,8$ мес.; в группе 2 – $54,0 \pm 25,2$ мес. ($p=0,045$).

В процессе вакцинотерапии дендритными клетками у всех пациентов был проведен анализ относительного содержания сывороточных уровней растворимых молекул HLA I класса и растворимого антигена CD8 [6].

Больные разделены на две группы. Группу 1 составили пациенты с повышенным начальным уровнем растворимых антигенов в сыворотке крови, а группа 2 состояла из больных с исходно пониженным сывороточным уровнем растворимых антигенов [6] (табл. 2).

Был проведен анализ относительного содержания сывороточного уровня S-100 в ходе вакцинотерапии у больных групп 1 и 2, распределенных относительно исходного уровня сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса и растворимого CD8-антигена.

Выявлено повышение относительного содержания сывороточного уровня S-100 в обеих группах больных по сравнению с контролем (группа здоровых доноров) в процессе лечения (табл. 3).

Из табл. 3 видно, что уровень относительного содержания S-100 в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой повысился в ходе лечения в обеих группах больных.

В группе 1 относительное содержание S-100 до лечения было в 1,3 раза выше показателей уровня данного маркера в контрольной группе; в ходе вакцинотерапии отмечено дальнейшее повышение S-100 – в 1,6 раза относительно нормальных значений у доноров, однако статистически достоверных различий выявлено не было.

В группе 2 относительное содержание уровня S-100 до лечения было повышено в 1,5 раза по сравнению с контролем; в ходе вакцинотерапии отмечено дальнейшее достоверное повышение уровня S-100 в 2,5 раза относительно нормальных значений исследуемого показателя в контрольной группе доноров.

Относительное содержание сывороточного уровня S-100 в группе 1 до начала вакцинотерапии было повышено в 1,4 раза относительно контроля. В процессе лечения выявлено достоверное повышение S-100 – в 2,1 раза относительно нормальных значений в контрольной группе.

В сыворотке крови пациентов группы 2 до начала вакцинотерапии уровень относительного содержания S-100 был сопоставим со значениями в контрольной группе доноров и в ходе лечения отмечено повышение относительного сывороточного содержания уровня S-100 в 1,2 раза относительно контроля, однако различия не имели статистически достоверного подтверждения.

Таблица 1

Относительное содержание S-100 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками ($M \pm m$), %

Группы	Среднее содержание S-100 (%)	
	До лечения	В процессе лечения
1. Все пациенты (55)	137,83±107,55*	196,83±201,27*
2. Группа 1 (24)	204,65±123,18 * ** *	294,36±251,40 * ** *
3. Группа 2 (31)	72,66±28,39 * ** *	111,43±64,40 * ** *
4. Контрольная группа (15)	99,99±24,93 ***	—

*статистически достоверные различия внутри группы до и в процессе лечения ($p < 0,05$);

по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$); *между группами 1 и 2 ($p < 0,05$).

Таблица 2

Относительное содержание сывороточных уровней растворимых молекул HLA I класса и растворимого антигена CD8 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками ($M \pm m$), %

Антиген	Группа 1 (n=33)		Группа 2 (n=22)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
HLA I	203,03±210,6***	165,80±97,2***	66,60±65,1***	77,47±46,4***
CD 8	137,54±92,36*	131,51±72,1*	88,0±38,7 (n=9)	57,25±8,6* (n=9)

*статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$);

**статистически достоверные различия между группами 1 и 2 ($p < 0,05$).

Таблица 3

Относительное содержание сывороточного уровня S-100 в группах 1и 2 в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками ($M \pm m$), %

Группы	Относительное содержание уровня S-100($M \pm m$), %	
	До лечения	В процессе лечения
1. HLA I – группа 1 (n=33) группа 2 (n=22)	130,06±116,58 150,19±93,45*	159,18±148,43 256,62±258,59* **
2. CD8 – группа 1 (n=46) группа 2 (n=9)	145,99±113,01* 94,73±60,67	211,41±214,56* 119,75±76,40

*статистически достоверные различия внутри группы (до и в процессе лечения) ($p < 0,05$);

**по сравнению с группой доноров ($p < 0,05$).

Заключение

Белок S-100 является сывороточным маркером меланомы. Уровень S-100 коррелирует с наличием метастазов в печени или кости, ответом на химио- и иммунотерапию. Повышение его уровня коррелирует с низкой продолжительностью жизни [17]. Согласно имеющимся в литературе данным, концентрация растворимых мембранных АГ сывотке крови может выступать как показатель тяжести течения и прогноза некоторых заболеваний, в том числе онкологических [9; 11]. Растворимые молекулы HLA I класса, взаимодействуя с мембранным CD8–АГ вызывают апоптоз цитотоксических Т-лимфоцитов [7; 9; 11]. При проведении анализа относительного сывороточного содержания S-100 у больных диссеминированной мелано-

мой были выявлены изменения между содержанием растворимых АГ LA I и CD8 и уровнем сывороточного S-100 в ходе вакцинотерапии дендритными клетками. У больных с повышенным сывороточным растворимым HLA I и пониженным растворимым CD8 повышение уровня S-100 в ходе лечения было менее выражено, тогда как при пониженных исходных значениях растворимого HLA I и повышенном CD8 в сывотке крови пациентов отмечено более значительное повышение уровня S-100 в процессе вакцинотерапии. Изучение изменения относительного содержания сывороточного уровня маркера меланомы S-100 и сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса и CD8–АГ у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками является актуальным [1; 3–5; 7–9; 11].

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

Литература

1. Алясова А.В., Пегов Р.Г., Михайлова Е.М. и др. Растворимые формы молекул HLA I класса в сывотке крови больных раком молочной железы и легкого // Нижегородский медицинский журнал. – 2008. – № 4. – С. 98–103.
2. Барышников А.Ю., Тоневский А.Г. Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. – М.: Медицина, 1997. – 212 с.
3. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2004. – Т. 2.
4. Барышников А.Ю. Биотерапия опухолей: неудачи и перспективы // Маммология. – 2007. – № 1. – С. 13–6.
5. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – Т. 1. – С. 6–10.
6. Голубцова Н.В., Михайлова И.Н., Новиков В.В. и др. Изменение сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса, антигена CD8 и растворимого комплекса HLA I-CD8 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 41–5.
7. Гостюжова Е.А., Ликов В.Ф., Караулов А.В., Новиков В.В. Особенности содержания растворимых молекул HLA I класса, CD8–антигена и их комплексов при хроническом миелолейкозе // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 3. – С. 33–8.
8. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Демидов Л.В. Вакцинотерапия меланомы дендритными клетками // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 8–18.
9. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. – 2007. – №4. – С. 249–53.

(окончание см. на стр. 112)

УДК 616-022:578.245.4

*Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков***ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИ-HIS ДОМЕНОВ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЧИСТКИ ИНТЕРФЕРОНА- α -2b ЧЕЛОВЕКА***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Кособокова Екатерина Николаевна, научный сотрудник лаборатории трансгенных препаратов НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-14-59;**e-mail:** ekkos@mail.ru

Статья поступила: 16.09.2010, принята к печати 07.10.2010.

Резюме

Интерфероны – важный класс цитокинов, нашедших широкое применение в медицинской практике, в частности в терапии онкологических заболеваний.

Для применения в клинике необходимо создание высокоочищенной субстанции. Современные препараты интерферонов соответствуют требованиям к качеству очистки, но поступают на потребительский рынок с ценами недоступными для многих больных. До сих пор остается актуальной проблема оптимизации процесса получения и очищения ИФН.

Для получения ИФН- α -2b человека (чИФН- α -2b) в данной работе использовали бактериальную систему экспрессии (*Escherichia coli*), в которую клонировали генетическую конструкцию, содержащую синтезированную и модифицированную последовательность целевого белка. Были созданы три генетические конструкции чИФН- α -2b: нативный белок, белок с одним (6His) и с двумя (12His) доменами. Идентификацию ИФН проводили с помощью метода Вестерн-блоттинга с антителами против чИФН- α и иммуноферментного анализа. Наши исследования показали, что в отношении уровня экспрессии и эффективности очистки наиболее удачна конструкция с одним 6His-доменом на N-конце.

Ключевые слова: интерфероны, His-домен, бактериальная экспрессия.*E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov***THE SIGNIFICANCE OF POLY-HIS DOMENS ON EXPRESSION LEVEL AND EFFICACY OF PURIFICATION OF HUMAN INT-A-2***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Interferons (IFN) belong to cytokines family and are widely used in clinic, particularly in cancer therapy.

Modern drugs fit the requirements of quality of clearing, but appear on the market with prices unacceptable for many patients. The problem of optimization of the production and purification of IFNs for simplification and cost reduction is still actual. Many laboratories are engaged in solving this problem in different countries.

For production of highly purified substances, we used pET bacterial expression system (*Escherichia coli*) for production of a human IFN- α -2b. The genetic design containing synthesized and modified sequences of target protein has been cloned. We have synthesized three genetic designs of hIFN- α -2b: without histidine tag and with domains consist of 6 or 12 histidine (6-His and 12-His). Proteins expressed were identified as IFN- α -2b using ELISA and Western blotting assays. Our data indicate that the design with the 6His on the N-end is the most successful construction either the level of expression or efficacy of purification.

Key words: interfereons, His-tag, bacterial expression.**Введение**

Последние достижения в геномике, протеомике и биоинженерии привели к экспоненциальному росту числа лекарственных белков, получаемых с использованием биотехнологий. Биотехнологический процесс включает в себя несколько этапов: продукция белка в экспрессионной системе, восстановление активности и очищение. Последний этап очень важен для последующего использования субстанции в качестве основы лекарственного препарата.

Перспективным методом очищения на данный момент является аффинная хроматография [10]. В основе технологии лежит избирательное взаимодействие белков с лигандом, ковалентно связанным с инертным носителем. Аффинный домен экспрессионного белка – удобный инструмент для проведения высокоэффективного очищения белка. Включе-

ние такой последовательности в генетическую конструкцию в зависимости от вида может оказывать как положительный, так и отрицательный эффект. К первым относятся [2]:

- Увеличение уровня экспрессии белка.
- Предотвращение протеолиза.
- Облегчение и увеличение эффективности рефолдинга.
- Увеличение растворимости.

С другой стороны, возможно проявление негативного действия включения аффинной метки, выражающееся в изменении конформации и снижении выхода белка. Одной из наиболее часто используемых аффинных последовательностей является полипептид из нескольких аминокислотных остатков гистидина (nHis) [8]. Полигистидиновый домен образует комплекс с ионами хелатных металлов (например, Ni^{2+}), иммобилизованных на NTA.

Образование таких комплексов стабильно происходит даже в присутствии высоких концентраций хаотропных агентов, таких как гуанидин гидрохлорид и мочевины. pHis – это небольшая не загружающая белок последовательность, которая не влияет на транспорт и сворачивание слитного белка внутри клетки, и, как правило, не нарушающая структуру и функционирование очищенного белка.

Среди терапевтических рекомбинантных белков ведущее место занимают цитокины, в частности – интерфероны, нашедшие широкое применение в медицине [1]. В клинике наиболее широко представлен ИФН- α -2b. Одной из важнейших областей использования этого белка является онкология.

Препараты ИФН включены в качестве вспомогательных агентов в схемы лечения ХМЛ, Т-клеточной НХЛ кожи, ММ, злокачественной меланомы и рака почки [3–5; 7; 9]. Препараты первого поколения (на основе природных интерферонов) практически полностью вытеснены рекомбинантными аналогами. Это связано с дефицитом и неоднородностью сырья (донорской крови) и высокой стоимостью конечного продукта.

До сих пор актуальной остается проблема оптимизации процесса получения и очистки ИФН. Решением этого вопроса занимаются в лабораториях разных стран.

Нашей целью стало изучение влияния включения различных типов полигистидиновых последовательностей (6 His и 12 His) на уровень экспрессии и эффективность очистки ИФН- α -2b человека (чИФН- α -2b). Важной идеей создания конструкции с увеличенным количеством гистидиновых остатков было предположение о возможности более тщательной отмывки рекомбинантного белка и возможности проведения процесса восстановления его конформационной структуры – рефолдинга – прямо на аффинной колонке за счет увеличения прочности связи между полигистидиновым доменом и Ni^{2+} -сефарозой. Для достижения цели в рамках данной работы нами были созданы синтетические генетические конструкции, содержащие последовательность чИФН- α -2b, модифицированную для экспрессии в бактериальной системе, и полигистидиновую последовательность.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды

Все манипуляции для клонирования вектора проводили в штамме *E. coli* dH5 α с генотипом F⁺ ϕ 80d lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 hsdR17(r⁻, m⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1. Для изучения экспрессии полученных конструкций выбрали штамм BL21 (DE3) с генотипом F⁺ ompT hsdS_B (r⁻, m⁺) gal dcm (DE3).

В работе использовали экспрессионные векторы фирмы Novagen pET-26b(+) и pET-28a(+). На их основе сконструировали плазмиды pEI26-60, pEM26 и pEM28. Все плазмиды обладают канамидиновой устойчивостью.

Конструкция экспрессионных векторов

Ген чИФН- α -2b был искусственно синтезирован на основе синтетической последовательности, построенной с учетом частоты встречаемости кодирующих кодонов ДНК в геноме *E. coli*.

Для получения модифицированной конструкции (чИФН- α -2b-6His), содержащей один 6His аффинный домен, использовали праймеры INF1 (cat atg cat cac cat cac cat cac gcg gat gat ga gat aaa) и INFrev1 (ccg aat tct tct tgc gga aagc) (рис. 1).

На краевых участках гена были введены сайты гидролиза эндонуклеазами *NdeI* и *XhoI*, необходимые для последующего переклонирования кодирующего фрагмента в экспрессионные векторы pET-26b(+) и pET-28a(+).

Фрагменты чИФН- α -2b и чИФН- α -2b-6His были клонированы в промежуточный вектор pBlueKS. Для получения экспрессионных векторов фрагмент чИФН- α -2b был переклонирован в вектор pET-26b(+), а фрагмент чИФН- α -2b-6His – в вектора pET-26b(+) и pET-28a(+) по сайтам гидролиза эндонуклеазами *NdeI* и *XhoI*. Конструкции получили названия pEI26-60, pEM26 и pEM28 соответственно (рис. 2).

Поиск бактериальных клонов, содержащих правильно сформированные вектора, проводили с помощью ПЦР. Для этого использовали праймеры: pET1 (tat agg gga att gtg agcgg) pET2 (gga tct cag tgg tgg tgg tg).

Экспрессия рекомбинантных белков

Штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформированный соответствующей плазмидой (pEI26-60, pEM26 и pEM28), культивировали в течение ночи в 20 мл среды LB (0,5 % дрожжевого экстракта (Sigma, США); 1 % триптона (Sigma, США); 1 % NaCl в воде) при 37 °C. 5 мл ночной культуры переносили в 35 мл среды SOC (0,5 % дрожжевого экстракта (Sigma, США); 2 % триптона (Sigma, США); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM глюкозы в воде), помещали на 37 °C до достижения OD₆₀₀=0,5–0,8, после чего добавляли IPTG до концентрации 0,5 mM. Далее пробы инкубировали при +15–18 °C в течение 7 ч. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансформированный штамм *E. coli* BL21(DE3).

Приготовление лизатов клеток

После культивирования клетки переносили в 50-миллилитровые пробирки и центрифугировали 10 мин при 4000 g. Осадок ресуспендировали в 2 мл лизирующего буфера следующего состава: 20 mM TrisHCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,1% Triton X-100; 0,02 % азида Na; 1mM CaCl₂; 0,1 mM PMSF.

Добавляли лизоцим до концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали при +4 °C в течение 1 ч. Качество лизирования бактериальной суспензии улучшали проведением циклов замораживания-размораживания в жидком азоте.

Для удаления вязкости лизат обрабатывали ДНКазой (Силекс, Россия) 30 мин при 37 °C. Полученную смесь центрифугировали 10 мин при 16 000 g. Надосадочную жидкость и осадок хранили при –20 °C.

Очистка тельца включения

Так как тельца включения обладают относительно высокой плотностью, их возможно отделить центрифугированием. После проведения лизиса и центрифугирования лизата полученный осадок в большой степени был обогащен тельцами включения, образованными чИФН- α -2b.

Для удаления растворимых белков бактериальной клетки проводили серию отмывок фосфатным буфером с 0,5M NaCl и 0,5% Tween20, с добавлением мочевины до 0,5 M; 2M и 4M в каждой последующей промывке соответственно. Для дальнейшей работы тельца включения растворяли в буфере 20 mM TrisHCl; 100 mM NaH₂PO₄; 0,05% Triton X-100; 6M гуанидинхлорид (GuCl), pH 8,0. Растворение проводили в течение 3–5 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием.

Аффинная хроматография

Растворенные отмывые тельца включения наносили на колонку с Ni^{2+} -сефарозой, собирали фракцию белков на выходе с целью последующего анализа эффективности связывания α -2b-6His и α -2b-12His с сорбентом. Удалили загрязняющие белки с колонки путем промывания 10 объемами буферного раствора (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 6 M GuCl, pH 8,0).

Рефолдинг целевого белка проводили на аффинной колонке, градиентно снижая концентрацию GuCl с 6 M до 0,5 M в течение 1,5–2 ч в присутствии окислительно-восстановительных агентов (глутатиона окисленного и восстановленного) и инкубировали ночь при +4 °C. Рефолдированный α -2b элюировали буферным раствором (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 100 mM Imidazol, pH 7,0), нерефолдированный – раствором (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 6 M GuCl, 150 mM Imidazol, pH 7,0).

Регенерацию колонки проводили с использованием 1M NaOH, это позволяло удалить белок, задержавшийся на колонке.

Полученные элюаты концентрировали, анализировали в ПААГ-электрофореze. Идентификацию α -2b проводили при помощи Вестерн-Блоттинга с антителами против ИФН- α (MMNA-2, PBL INTERFERON SOURCE, США).

Результаты и обсуждение**Конструкция экспрессионных векторов**

В результате генно-инженерных манипуляций были получены три рекомбинантные плазмиды, содержащие гены α -2b (см. рис. 2):

1. pEI26-60 (содержит ген α -2b, клонированный в плазмиду pET26).
2. pEM26 (содержит ген α -2b-6His, клонированный в плазмиду pET26).
3. pEM28 (содержит ген α -2b-12His, клонированный в плазмиду pET28).

Экспрессия рекомбинантных белков

Полученные гибридные конструкции находятся под контролем сильного вирусного T7 промотора и lac оператора, что позволяет достигать высокого уровня экспрессии в *E. coli* и обеспечивает надежную регуляцию транскрипции [6]. После индукции клетки штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиды pEI26-60, pEM26, и pEM28, продуцировали рекомбинантные белки размером приблизительно 17,5 кДа, 18,5 кДа и 20,0 кДа соответственно – рис. 3: (2; 5; 8).

Результаты нашей работы показали, что наличие полигистидинового домена на N-конце последовательности значительно увеличивает уровень экспрессии рекомбинантного ИФН- α -2b человека. При этом увеличение аффинной последовательности до 12His на N-конце несколько снижает ее (см. рис. 3: 2; 5; 8). Это соответствует литературным данным о положительном влиянии 6His аффинного домена на уровень экспрессии [2].

Для количественной оценки экспрессии целевого белка проводили сравнение интенсивности полос на электрофореграмме при помощи программы GeneTools (Syngene, США).

В целом рекомбинантные белки, содержащие полигистидиновую систему, составляют более 30% всех белков клетки. Это высокие показатели, дающие возможность последующего внедрения процесса в промышленную технологию.

Очистка рекомбинантных белков

Агрегация рекомбинантных эукариотических белков в процессе бактериальной экспрессии является результатом нарушения конформационной структуры белка. При этом происходит взаимодействие гидрофобных участков белковой последовательности с образованием белковых глобул. В процессе экспрессии целевой белок практически полностью агрегировался в виде телец включения, и частичная очистка от бактериальных белков проходила уже на этапе центрифугирования культуральных лизатов: целевой белок полностью оставался в осадке (рис. 3: 4; 7; 10). ИФН в виде телец включения плохо растворим, что сделало возможным проведение предварительной стадии очистки, путем отмывки телец включения. В ходе работы мы выяснили, что для α -2b и α -2b-12His необходимо пересмотреть состав буферов в сторону уменьшения концентрации мочевины до 2M, т.к. часть целевого белка терялась. С другой стороны, эта стадия необходима для α -2b-6His, т.к. в последующем это увеличивает эффективность связывания белка с сорбентом и качество отмывки от белков бактериальной клетки. Чистота рекомбинантного белка после отмывки ТВ составляет около 80% (рис. 4).

Благодаря наличию в составе гибридного целевого белка аффинного домена, обладающего выраженным сродством к Ni^{2+} -сефарозе, стало возможным использование на последующем этапе очистки аффинной хроматографии. После нанесения растворенных телец включения на колонку собирали фракцию с несвязавшимися с сорбентом белками, чтобы оценить эффективность сорбции целевого белка на колонку. Было показано, что α -2b-6His полностью связывается с Ni^{2+} -сефарозой, а основная часть бактериальных белков не задерживается на колонке (рис. 5: 2). После проведения серии отмывок наносили элюирующий буфер, посредством которого происходит разрушение связи между аффинным доменом и активными центрами и никелевым сорбентом. Элюаты собирали и оценивали при помощи ПААГ-электрофореze. Конечный продукт очищен более, чем на 90% (рис. 4: 8, рис. 5: 3; 4).

Аналогичные результаты были получены и для α -2b-12His. Был сделан вывод, что наличие дополнительной гистидиновой последовательности не влияет значительно на эффективность посадки белка на колонку и емкость сорбента.

Рефолдинг

Проведение процесса рефолдинга гибридного белка интерферона в связанном с сорбентом состоянии представляет большой интерес. Для этой цели сочетание аффинных His-последовательностей и металл-хелатной хроматографии является оптимальным. Одним из важных преимуществ можно считать тот факт, что эффективность специфического связывания гибридного белка с активными группами на сорбенте происходит в присутствии высоких концентраций хаотропных агентов, таких как гуанидин гидрохлорид. Подчеркнем, что при таком подходе обеспечивается пространственное разделение молекул рефолдируемого белка, исключая его агрегацию. За счет компактного, но "зафиксированного" расположения молекул белка на сорбенте отпадает необходимость в больших объемах буферных растворов и сильных разведений, присущих классической технологии рефолдинга. Еще одним положительным преимуществом рефолдинга на колонке стала возможность в дальнейшем производить ферментативное отщепление аффинного домена также непосредственно на колонке.

Синтезированный фрагмент чИФН- α -2b (ifn)

cat
atg tgc gat ctg ccg cag acc cat agc ctg ggt agc cgt cgc acc ctg atg ctg ctg gcc cag atg cgt cgc att agc ctg ttt agc tgc
ctg aaa gat cgt cac gat ttc ggc ttt ccg caa gaa gaa ttc ggt aac cag ttt cag aaa gcg gaa acc att ccg gtg ctg cat gaa atg atc cag
cag att ttt aat ctg ttc agc acc aaa gat agc tca gcg gca tgg gat gaa acc ctg ctg gat aaa ttt tat act gaa ctg tac cag cag ctg aac
gat ctg gaa gcg tgc gtg att cag ggt gtt ggc gtg acc gaa acc ccg ctg atg aaa gaa gac agc att ctg gca gtt cgc aaa tat ttt cag cgt
att acc ctg tat ctg aaa gaa aaa aaa tac tca ccg tgc gcg tgg gaa gtg gtt cgc gcc gaa att atg cgc agc ttt agc ctg agt acc aac ctg
cag gaa agc ctg cgt agc aaa gaa taat ctcgag

Модифицированный фрагмент чИФН- α -2b-His (mod)

cat
atg cat cac cat cac cat cac gcg gat gat gac gat aaa tgc gat ctg ccg cag acc cat agc ctg ggt agc cgt cgc acc ctg atg
ctg ctg gcc cag atg cgt cgc att agc ctg ttt agc tgc ctg aaa gat cgt cac gat ttc ggc ttt ccg caa gaa gaa ttc ggt aac cag ttt cag
aaa gcg gaa acc att ccg gtg ctg cat gaa atg atc cag cag att ttt aat ctg ttc agc acc aaa gat agc tca gcg gca tgg gat gaa acc ctg
ctg gat aaa ttt tat act gaa ctg tac cag cag ctg aac gat ctg gaa gcg tgc gtg att cag ggt gtt ggc gtg acc gaa acc ccg ctg atg aaa
gaa gac agc att ctg gca gtt cgc aaa tat ttt cag cgt att acc ctg tat ctg aaa gaa aaa aaa tac tca ccg tgc gcg tgg gaa gtg gtt cgc
gcc gaa att atg cgc agc ttt agc ctg agt acc aac ctg cag gaa agc ctg cgt agc aaa gaa taat ctcgag

cat cac cat cac cat cac – 6His;

gcg gat gat gac gat aaa – сайт гидролиза белка энтерокиназой.

Рис. 1. Генетические последовательности, кодирующие чИФН- α -2b.

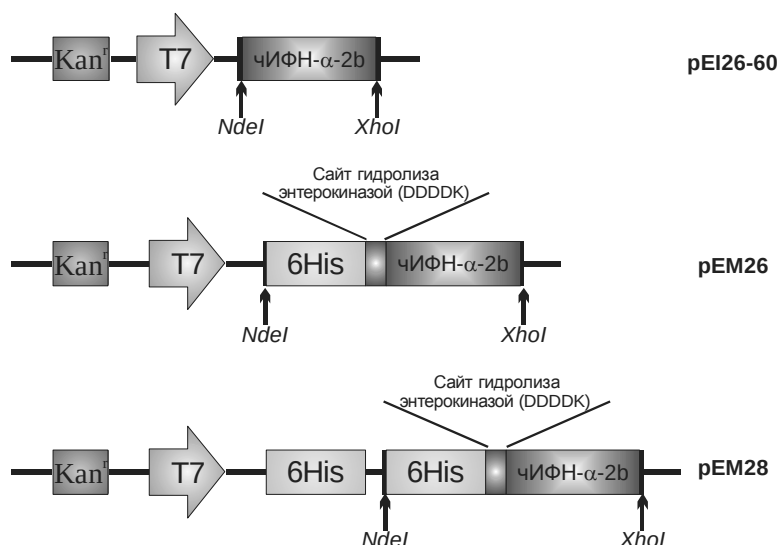


Рис. 2. Плазмидные векторы, полученные в рамках данной работы для изучения экспрессии чИФН- α -2b в *E. Coli*.

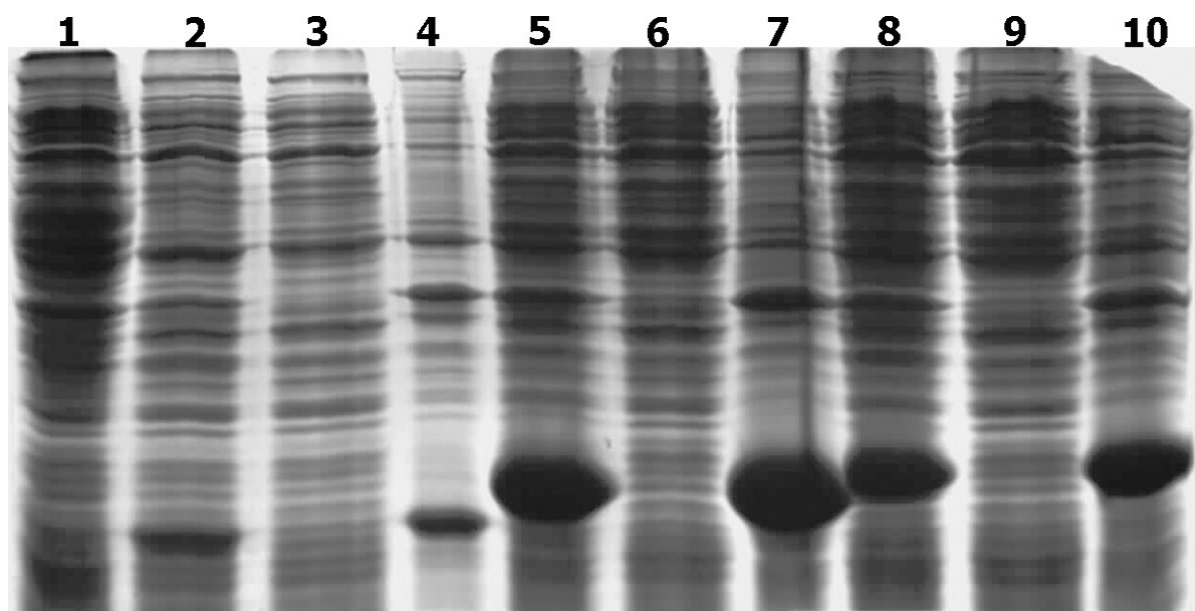


Рис. 3. Электрофореграмма проб, полученных в результате центрифугирования лизатов бактериальных клеток (стрелки – положение целевого белка в лизатах).

1 – Лизат клеток BL21(DE3) без рекомбинантной плазмиды;

2-4 – Лизат (2), супернатант (3) и осадок (4) после центрифугирования лизата клеток BL21(DE3), экспрессирующих ИФН- α -2b;

5-7 – Лизат (5), супернатант (6) и осадок (7) после центрифугирования лизата клеток BL21(DE3), экспрессирующих ИФН- α -2b-6His;

8-10 – Лизат (8), супернатант (9) и осадок (10) после центрифугирования лизата клеток BL21(DE3), экспрессирующих ИФН- α -2b-12His.

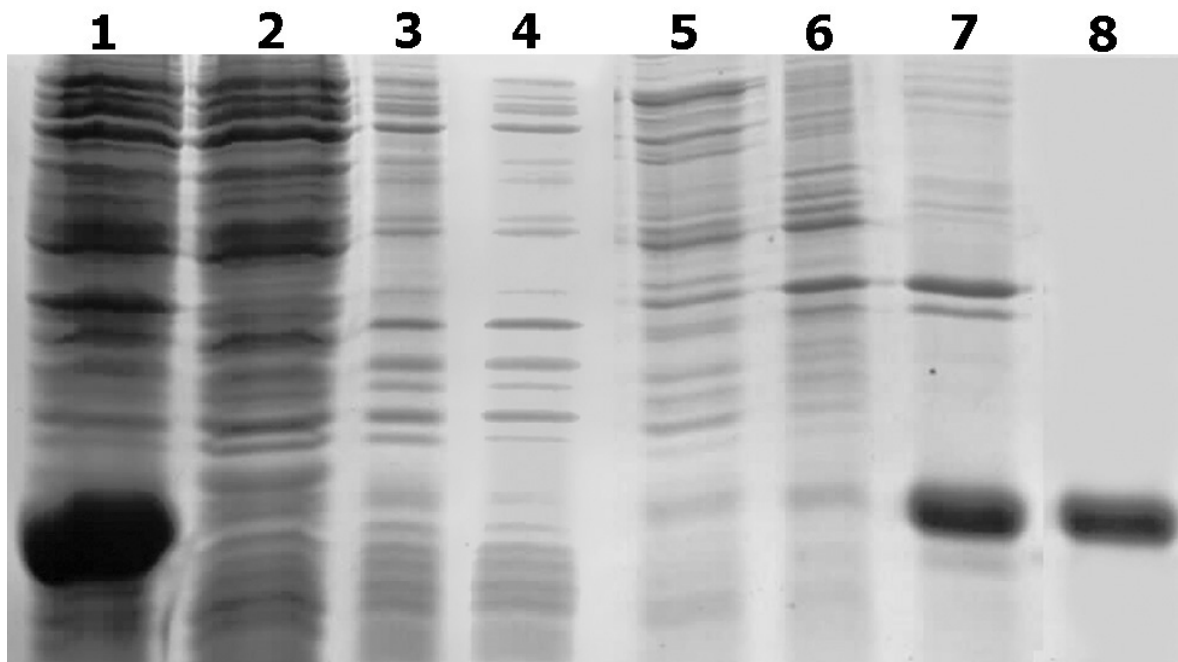


Рис. 4. Электрофореграмма проб, полученных в результате отмывки чИФН-α-2b-6His.
 1 – Лизат клеток BL21(DE3), экспрессирующих ИФН-α-2b-6His;
 2 – Супернатант после центрифугирования лизата;
 3–6 Последовательные отмывки телец включения. Супернатанты после центрифугирования;
 7 – Отмытые тельца включения;
 8 – ИФН-α-2b-6His после очистки на Ni^{2+} колонке.

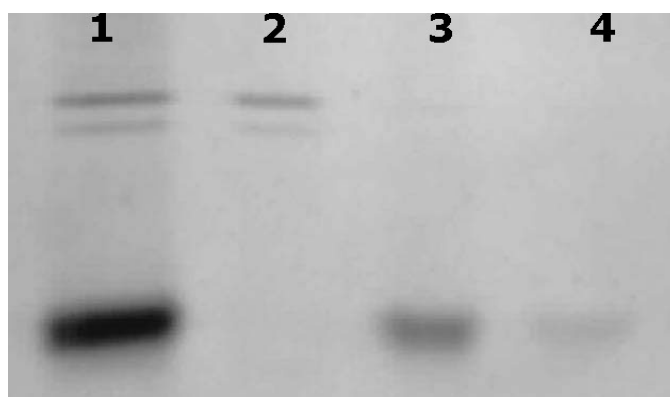


Рис. 5. Электрофореграмма элюатов, полученных после нанесения отмытых телец включения на колонку.
 1 – Отмытые тельца включения ИФН-α-2b-6His, наносимые на колонку;
 2 – Белки бактериальной клетки, не связавшиеся с сорбентом;
 3 – Элюция целевого белка, первая фракция;
 4 – Элюция целевого белка, вторая фракция.

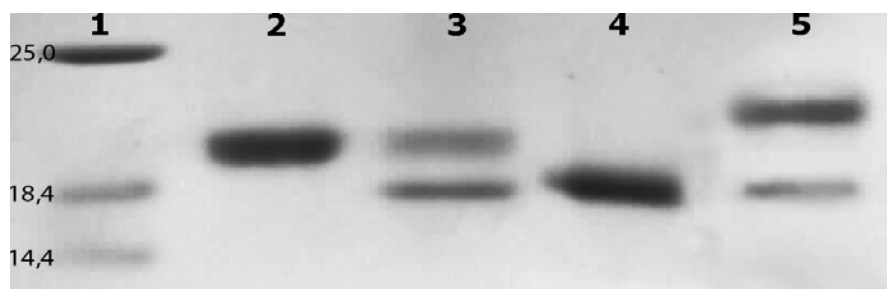


Рис. 6. Электрофореграмма, иллюстрирующая результат гидролиза L-NEP чИФН-α-2b-6His.
 1 – Маркер весов;
 2 – чИФН-α-2b-6His;
 3 – чИФН-α-2b-6His после гидролиза L-NEP;
 4 – чИФН-α-2b (контроль).
 5 – чИФН-α-2b-12His после гидролиза L-NEP;

Опираясь на проведенные ранее эксперименты, было решено проводить рефолдинг по следующей схеме: ТВ наносили на колонку в буферном растворе А (0,5М NaCl, 0,5 М Tris-HCl, 6 М GuCl, 5мМ Imidazol, 1мМ Oxidized Glutathione, 4мМ reduced Glutathione, pH 8,0), а затем градиентно в течение 2-3 ч снижали концентрацию гуанидин гидрохлорида в растворе, пропускаемом через колонку до 0,5М. Такой подход обеспечил эффективность рефолдинга до 70-80%. Следует отметить, что для чИФН- α -2b-12His процент восстановления конформации белка был несколько ниже (60-70 %). Объяснить это можно размерами аффинного домена (12 His), образующего конформационно более жесткую структуру, мешающую правильному сворачиванию белка. Такой результат является достаточно высоким по сравнению с литературными данными (40-50 %) и более чем интересным с точки зрения его использования для разработки производственных технологий очистки рекомбинантных белков и интерферона человека в частности.

Удаление полигистидинового домена

На заключительном этапе проводили расщепление гибридного белка легкой цепью энтерокиназы (L-NEP) [с целью удаления полигистидинового домена (6 His и 12 His)]. Эффективность гидролиза гибридного белка в случае чИФН- α -2b-6His составила порядка 50%, в случае чИФН- α -2b-12His – 40% (рис. 6). В соответствии с литературными данными возможно было получить более высокие цифры (80-90%). Невысокую эффективность гидролиза мы объясняем отсутствием в генетической конструкции нейтрального полилинкера между полигистидиновой последовательностью и сайтом отрезания энтерокиназой.

Литература

1. Рафальский В.В. Клиническое применение препаратов интерферона. – Смоленск, 1997. – С. 120.
2. Arnau J., Lauritzen C., Petersen G.E., Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins // Protein Expr Purif. – 2006. – 48. – P. 1–13.
3. Ascierto P.A., Kirkwood J.M. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade // J Transl Med. – 2008. – 6. – P. 62–73.
4. Baccarani M., Rosti G., de Vivo A. et al. A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia // Blood. – 2002. – 99(5). – P. 1527–35.
5. Ferrantini M., Capone I., Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use // Biochimie. – 2007. – 89(6–7). – P. 884–93.
6. Jana S., Deb J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli // Appl Microbiol Biotechnol. – 2005. – 67(3). – P. 289–98.
7. Mills E.J., Rachlis B., O'Regan C. et al. Metastatic renal cell cancer treatments: An indirect comparison meta-analysis // BMC Cancer. – 2009. – 27. – P. 9–34.
8. Neves F.O., Ho P.L., Raw I. et al. Overexpression of a synthetic gene encoding human alpha interferon in Escherichia coli // Protein Expr Purif. – 2004. – 35. – P. 353–9.
9. Parmar S. and Platanius L.C. Interferons: mechanisms of action and clinical applications // Curr Opin Oncol. – 2003. – 15. – P. 431–9.
10. Zachariou M. Affinity Chromatography / Methods and Protocols // Springer. – 2007. – P. 360.

(окончание литературы к статье: Н.В. Голубцовой и соавт. «ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ...»)

10. Новиков В.В., Евсегнеева И.В.. Новые дифференцировочные антигены человека, утвержденные на VII Международном воркшопе // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 3–6.
11. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю.. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. – М.: изд-во МИА, 2008. – 243 с.
12. Сергеева Н.С., Мишунина М.П., Силина И.А. и др. Значение уровня сывороточного белка S-100 при меланоме // Российский онкологический журнал. – 2007. – № 4. – С. 13–6.
13. Сергеева Н.С., Лазутина Т.Н., Мишунина М.П. и др. Определение белка S-100 как серологического опухолеассоциированного маркера при меланоме // Российский онкологический журнал. – 2008. – №2. – С. 19–22.
14. Bottoni U., Izzo P., Richetta A. et al S-100 serum level: a tumor marker for metastatic melanoma // Melanoma Res. – 2003. – 13. – P. 427–9.
15. Contini P., Zochi M.R., Pierri I. et al. In vivo apoptosis of CD8 (+) lymphocytes in acute myeloid leukemia patients: involvement of soluble HLA-I and Fas ligand // Leukemia. – 2007. – 2. – P. 253–60.
16. Puppo F., Indiveri F., Seudeletti M., Ferrone S. Soluble HLA antigens: new roles and uses // Immunol.Today. – 1997. – 18(4). – P. 154–5.
17. Puppo F., Ghio M., Contini P. et al Immunoregulatory role of soluble HLA molecules: a new skin for an old subject? // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 1998. – 46(3). – P. 157–60.
18. Henze G., Dummer R., Joller-Jemelka H. et al. Serum S-100 – a marker for disease Monitoring in metastatic melanoma // Dermatology. – 1997. – 194. – P. 208–12.

Такой участок, состоящий из простых линейных аминокислот, не образующих жестких структур, является конформационно гибким и позволяет крупной молекуле энтерокиназы без помех подойти к сайту гидролиза.

Заключение

Наши исследования показали, что наличие полигистидиновой системы увеличивает уровень экспрессии рекомбинантного ИФН- α -2b человека (рис. 3: 2; 5; 8). При этом дополнительные 6His несколько снижает ее. В литературе приводятся данные об увеличении растворимости белка при включении ряда аффинных меток.

В исследованиях, описанных в данной статье, не наблюдалось какой-либо значимой разницы в эффективности растворения белка с полигистидиновой последовательностью и без нее. В любом случае в растворах присутствовал GuCl в концентрации 6М и процесс занимал около 3–5 ч.

В исследованиях была также показана разница в эффективности гидролиза энтерокиназой (рис. 6), о чем подробно обсуждалось выше. Для чИФН- α -2b-12His она была на 10–20 % ниже, чем для чИФН- α -2b-6His.

На основании полученных результатов мы пришли к выводу, что в отношении уровня экспрессии и эффективности очистки наиболее удачна конструкция с одним 6His на N-конце гибридного белка интерферона человека.

Дальнейшие исследования в отношении масштабирования технологического процесса получения рекомбинантного белка планируется проводить именно с конструкцией, содержащей чИФН- α -2b-6His.

УДК 616.94-022:611.018.5:615.033.1

*Н.Ю. Анисимова¹, В.А. Даванков², М.И. Будник¹, Т.С. Спирина², М.В. Киселевский¹***НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИСТИРОЛА, СПОСОБНЫЕ ЭЛИМИНИРОВАТЬ МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ КРОВИ**¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва**Контактная информация:***Анисимова Наталья Юрьевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(926)264-20-36;**e-mail:** an_na1708@inbox.ru

Статья поступила: 26.07.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

В настоящем исследовании оценена способность пористых полистирольных сорбентов Стиросорб 414, Стиросорб 516, Стиросорб 514 элиминировать из крови грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Кровь, в которую ввели бактериальную взвесь, пятикратно пропускали под давлением через макет гемосорбционной колонки, заполненный тестируемым сорбентом, и производили посев на чашки с плотной питательной средой.

Выявленное значительное снижение колониеобразования *St.aureus* в гемокультуре после гемосорбции (на 51–88 %) с высокой степенью вероятности может рассматриваться как результат связывания с использованным сорбентом бактериальных клеток, т.е. их элиминации из крови. Эффект торможения колониеобразования *K. pneum. pneumoniae* после контакта крови с сорбентом был выражен менее ярко и не превышал 10 %. Среди протестированных сорбентов наиболее эффективен Стиросорб 414.

Полученные данные позволяют рассматривать сверхсшитые полистиролы ряда Стиросорб в качестве перспективных гемосорбентов для лечения больных сепсисом.

Ключевые слова: сорбент, стирсорб, бактерии, сепсис, гемосорбция.*N.Yu. Anisimova¹, V.A. Davankov², M.I. Budnik¹, T.S. Spirina², M.V. Kiselevsky¹***NEW PERSPECTIVE SORBENTS BASED ON POLYSTYRENE, CAPABLE OF TO ELIMINATE OF MICROORGANISMS FROM BLOOD**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds RAS, Moscow**Abstract**

In this study we have estimated the ability of porous polystyrene sorbents Styrosorb 414, Styrosorb 516, Styrosorb 514 to eliminate grampositive and gramnegative microorganisms from blood. Blood containing a bacterial suspension was passed under the pressure through the hemosorption column model with tested sorbent, and seeded in complete medium on dishes.

The significant decrease of *St. aureus* colony-formation ability haemoculture after hemosorption (51–88 %) can be considered as a result of bacterial binding to the used sorbents, i.e. elimination of bacteria from blood. The inhibition of colony-forming ability by *K. pneum. pneumoniae* after a blood-sorbent contact was less obvious and did not exceed 10 %. Styrosorb 414 was the most effective among the tested sorbents.

The obtained dates allow to consider the hypercrosslinked polystyrene of the series Styrosorb as perspective haemosorbents for treatment of patients with sepsis.

Key words: Sorbent, styrosorb, bacteria, sepsis, hemosorption.**Введение**

В настоящее время зреет убеждение, что в комплексном лечении сепсиса лечебные мероприятия системного характера (антибактериальная и иммунная терапия) могут быть выгодно дополнены методами экстракорпоральной детоксикации.

В частности, накоплено достаточно большое количество сообщений о благоприятном влиянии на состояние больных с сепсисом своевременной процедуры гемосорбции [6; 7].

Эта процедура не только способствует улучшению реологических свойств крови, но и значительно снижает содержание в системном кровотоке триггерных факторов воспаления (бактериальные эндотоксины, цитокины) [8; 9]. Кроме того, имеются данные, что некоторые сорбенты способны

прочно иммобилизовать на своей поверхности бактериальные клетки [3]. Все вышеизложенное указывает на необходимость поиска новых сорбентов, эффективных в случае лечения больных с сепсисом за счет удаления бактериальных клеток из кровотока пациента.

Одним из перспективных направлений в этом плане представляется использование в качестве гемосорбентов сверхсшитых полистиролов, способность которых элиминировать из биологических жидкостей соединения с самыми различными физико-химическими свойствами была убедительно продемонстрирована [1; 2; 4; 5]. Целью настоящего исследования являлось изучение способности новых пористых полистирольных сорбентов ряда Стиросорб иммобилизовать различные микроорганизмы из физиологических жидкостей.

Материалы и методы

Все тестируемые сорбенты (Стиросорб 414, Стиросорб 516, Стиросорб 514) представляли собой гранулы диаметром 0,3–1,0 мм с развитой внутренней структурой. Подготовка сорбентов к исследованию включала 3-кратное промывание этанолом, стерильными водой и физиологическим раствором хлорида натрия. Подготовленными сорбентами (10 г) набивали макеты гемосорбционных колонок. Для исследований использовали взвеси 20-часовых бактериальных культур. Разведение взвесей соответствовало 0,5 единицы по шкале мутности McFarland. В пробирки с кровью здоровых доноров (450 мл) вводили по 5 мл взвеси грамположительных (*St. aureus*) и грамотрицательных микроорганизмов (*K. pneumoniae pneumoniae*). Подготовленную таким образом кровь 5-кратно пропускали под давлением через макеты гемосорбционных колонок, заполненных тестируемыми сорбентами. Далее производили посев на чашки с плотной питательной средой равных объемов крови после процедуры гемосорбции (ГС) и крови, не подвергавшейся контакту с сорбентом. Кровь, содержащую *St. aureus*, высевали на маннит-солевой агар (Panadisa, Испания), а содержащую *K. pneumoniae pneumoniae* – на среду Эндо (Panadisa, Испания). Все работы производили с соблюдением условий стерильности. Учет результатов проводили через 24 ч, вычисляя показатель торможения колониеобразования (ТКО) гемокультуры после ГС по формуле:

$$TKO = \frac{KK_{\text{после ГС}}}{KK_{\text{контроль}}} \times 100, \text{ где}$$

KK – среднее количество колоний в 1 см³ поверхности зоны культурального роста (расчет не менее чем по 10 квадратам).

Результаты и обсуждение

Для определения способности полистирольных сорбентов удерживать клетки бактерий из крови пациентов был использован сравнительный анализ количества колоний микроорганизмов, сформировавшихся на поверхности плотной питательной среды при высевании на нее равных объемов крови, содержащей бактериальные клетки, до и после контакта крови с сорбентом. Поскольку бактериальная колония является результатом деления одной клетки, называемой колониеобразующей, уменьшение количества колоний после ГС можно расценивать как результат иммобилизации микроорганизмов сорбентом. Различия в интенсивности роста колоний гемокультуры *St. aureus* на маннит-солевом агаре при высевании образцов крови до и после ГС на разных сорбентах проиллюстрированы на рис. 1. В контрольном опыте рост бактериальной культуры за счет утилизации маннита, содержащегося в питательной среде, приводит к сдвигу pH среды в кислую сторону и соответственно к изменению цвета агара с розового на желтый. В культуре крови после контакта с испытуемыми сорбентами наблюдается снижение колониеобразования *St. aureus*, что проявляется в существенно меньшем изменении первоначального розового цвета агара. Количественная оценка обнаруженного эффекта ТКО двух гемокультур после ГС приведена на рис. 2.

Литература

1. Елизаров Д.П., Елькин А.И., Даванков В.А. и др. Экспериментальное изучение сорбционной активности распространенных адсорбентов // Эффективная терапия – 2003. – 9(3). – С. 58–61.
2. Елизаров Д.П., Елькин А.И., Даванков В.А. и др. Изучение сорбционной активности адсорбентов в эксперименте // Токсикологический вестник. – 2003. – №2. – С. 18–21.

Представленные данные демонстрируют значительное уменьшение колониеобразования *St. aureus* после очистки крови в процессе ГС. Наиболее значительной задержки колониеобразования (на 88 %) удалось достичь в результате очистки крови Стиросорбом 414. Контакт крови с сорбентами Стиросорб 516 и Стиросорб 514 также приводил к резкому снижению количества выросших колоний (на 63 и 51 % соответственно). Это свидетельствует о значительном снижении количества колониеобразующих единиц грамположительных микроорганизмов, оставшихся в крови после фильтрации через слой тестируемых сорбентов. В то же время результат очистки крови от физиологически активных грамотрицательных бактерий с применением тестируемых сорбентов был гораздо более скромным. Наибольший эффект (ТКО = 21 %) был достигнут в результате применения для гемосорбции Стиросорба 414. В остальных случаях эффект снижения колониеобразования был выражен слабее (10 и 2 % для Стиросорб 516 и Стиросорб 514 соответственно). В настоящее время сверхсшитые полистирольные сорбенты могут рассматриваться как наиболее перспективные неспецифические гемосорбенты, обладающие хорошей гемосовместимостью и высокой сорбционной активностью по отношению к низкомолекулярным химическим веществам и белкам типа цитокинов. В структуре сорбентов полистирольного класса удастся создать поры, сопоставимые с размерами бактериальных клеток, но существенно меньшие размеров форменных элементов крови. В результате проведенных исследований был выявлен уменьшение количества колониеобразующих единиц *St. aureus* и *K. pneumoniae pneumoniae* при контакте содержащих бактерии образцов крови с тремя образцами материалов на основе сверхсшитых полистиролов ряда Стиросорб. Данные микроорганизмы характеризуются различными размерами, формой, структурными и биохимическими характеристиками внешней мембраны и, вероятно, именно этим был обусловлен различный эффект применения тестируемых сорбентов к данным культурам. Выявленное значительное снижение колониеобразования (на 51–88 %) *St. aureus* – мелких 0,5×1,0 мкм кокков – после ГС с высокой степенью вероятности может рассматриваться как результат связывания бактериальных клеток с сорбентом, т.е. их элиминации из крови. Кроме того, проведенные нами эксперименты позволяют сделать вывод о том, что сорбенты ряда Стиросорб, по-видимому, могут связывать также и грамотрицательные бактерии, хотя выявленный эффект и не был столь же ярким, как на модели стафилококка.

Эти данные были получены на взвеси *K. pneumoniae pneumoniae* – грамотрицательной, мелкой (0,5–0,8 × 1–2 мкм) бактерии, способной к образованию капсулы, что вероятно может препятствовать сорбции этого микроорганизма на гранулах испытанных трех образцов Стиросорба.

Заключение

Таким образом, полученные в настоящей работе данные о способности сверхсшитых полистиролов элиминировать из крови микроорганизмы еще дают дополнительные основания рассматривать сорбенты ряда Стиросорб в качестве перспективных гемосорбентов для лечения больных сепсисом.

(Окончание см. на стр. 126)

УДК 616.25-006.32-092.4:615.277.3

*Л.Н. Пылев, Л.А. Васильева, О.В. Смирнова***ТОРМОЗЯЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА «ГАЛАВИТ™»
НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМОЙ МЕЗОТЕЛИОМЫ ПЛЕВРЫ У КРЫС WISTAR**
*РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Пылев Лев Николаевич, заведующий лабораторией природных канцерогенов НИИ канцерогенеза***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)323-50-10;**e-mail:** pylev@crc.umos.ru

Статья поступила: 12.03.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Препарат «Галавит™» полностью тормозил рост перевитой подкожно крысам *Wistar* мезотелиомы плевры, индуцированной у крыс асбестом. Обсуждается возможный механизм этого явления.

Ключевые слова: препарат «Галавит™», мезотелиома плевры, опухоль.

*L.N. Pylev, L.A. Vasilieva, O.V. Smirnova***THE EFFECT OF GALAVITE™
ON PLEURAL MESOTHELIOMA GROWTH IN WISTAR RATS**
*N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Here we show that pleural mesothelioma growth induced by asbestos subcutaneously in Wistar rats was significantly reduced by Galavite. We discuss the possible mechanism of the observed phenomenon.

Key words: galavit, mesothelioma of pleura, tumor.

Введение

Химиотерапия – один из эффективных методов лечения онкологических больных, а разработка новых химиопрепаратов – актуальное и перспективное направление современной онкологии.

Мезотелиома плевры – достаточно редкая опухоль, однако хорошо известно, что при определенных условиях ее частота у людей может существенно увеличиваться. Основными факторами риска является производственное экспонирование высокими дозами асбестоносителей и некоторыми другими природными и синтетическими волокнистыми пылями, причем важное значение имеют физико-химические свойства волокна. К доказанным факторам риска современная наука относит также эрионит и тортотраст. Механизм канцерогенного действия волокон до конца не исследован, однако в патогенезе развития мезотелиальной опухоли макрофаги, вероятно, играют важную роль [5].

Нами показано, что в условиях постоянного повышенного пула макрофагов в брюшной полости крыс процент индуцированных асбестом мезотелиом брюшины существенно снижается [6]. В связи со сказанным представлялось интересным изучить лекарственные препараты, механизм действия которых связан с макрофагами. В данной работе было исследовано влияние препарата «Галавит™» на перевиваемую на крысах *Wistar* мезотелиому плевры.

Материалы и методы

В экспериментах была использована перевиваемая подкожно крысам *Wistar* мезотелиома плевры, полученная изначально у крысы этой линии внутривенным введением хризотил-асбеста и прошедшая 30 пассажей. Морфологически она представляла собой солидную карциномоподобную опу-

холь. Мезотелиома перевивалась практически в 100 % случаев и могла прощупываться уже на 5–7 день после перевивки. Продолжительность жизни животных с перевивной мезотелиомой составляла около 1,5–2 мес. Препарат «Галавит™» получен из фирмы «Медикор», там же была рекомендована схема его введения животным. Самцы крыс линии *Wistar* разведения РОНЦ с начальной массой тела около 150 г были разделены на 2 группы по 10 животных в каждой (опытная – препарат «Галавит™» и контрольная – раствор Хенкса). Всем животным подкожно в область бедра перевито по 50 мг опухолевого гомогената в 0,5 мл раствора Хенкса. препарат «Галавит™» вводили подкожно в дозе 0,37 мг в 1 мл раствора Хенкса через день трижды до перевивки и через день после нее в течение всего эксперимента. Контрольным крысам вводили подкожно по 1 мл раствора Хенкса по схеме препарат «Галавит™» а после перевивки опухолевой ткани. Животных наблюдали в течение 30 дней. Оценивали процент прививаемости опухоли и ее объем, используя стандартные математические методы.

Результаты и обсуждение

Препарат «Галавит™» представляет собой натриевую соль аминофалазина. Первоначально (1997) он был предложен в качестве противовоспалительного средства, обладающего также иммуномодулирующими свойствами. Показано, что «Галавит™» воздействует на клетки моноцитарно-макрофагального ряда и увеличивает функциональную активность макрофагов [1]. Опосредованное позитивное действие препарат «Галавит™» было показано как в условиях эксперимента на ряде опухолевых штаммов, так и в условиях клиники при различных заболеваниях в том числе и онкологических [2; 3; 4; 8; 9]. Результаты наших экспериментов приведены в таблице.

Таблица

Изменение объема перевитой подкожно крысам *Wistar* мезотелиомы плевры при введении галавита, см³

Дни								
5	7	10	14	17	19	21	25	30
0,8±0,05	1,5±0,4	8,0±1,2	12,5±1,9	18,5±2,1	56,0±5,6	74,2±6,2	90,0±7,3	72,5±4,5
1,2±0,2	2,2±0,6	6,5±1,7	11,3±2,3	7,2±2,3	10,0±2,0	0	0	0

Прививаемость опухоли в обеих группах была практически одинаковой – 80 % в контроле, 100 % – препарат «Галавит™». Опухоль прощупывалась, начиная с 5 дня после перевивки. До 14 дня прирост ее объема был одинаков в контроле и опыте, однако к 17 дню и позже в опыте с препаратом «Галавит™» наблюдалось резкое торможение ее роста, к 25 дню опыта ни у одного животного опухоль не прощупывалась. В контрольной группе животных за 30 дней погибло 3 крысы. У них и у забитых в конце опыта животных сохранялось строение солидной карциноподобной перевивной мезотелиомы. У забитых крыс в опухоли было много очагов некроза, в основном, центрального. В серии с препаратом «Галавит™» в течение 30 дней гибели животных не было. У забитых в конце опыта крыс на месте введения суспензии опухолевой ткани было ничего не обнаружено или найдены небольшие уплотнения, при микроскопическом исследовании не содержащие опухолевых клеток.

Таким образом, препарат «Галавит™» проявил существенное тормозящее действие на рост перевитой крысам мезотелиомы плевры, почти полностью его тормозя. Учитывая механизм действия препарата «Галавит™», такой эффект можно было в определенной степени предположить, основываясь на наших ранее проведенных исследованиях. По нашим данным в условиях культур клеток продукты секреции макрофагов оказывают тормозящее действие на трансформацию клеток мезотелия [7; 10] и токсическое дозозависимое действие на трансформированные и мезотелиомные клетки, причем на последние более выраженное [10]. Такие эффекты могут быть обусловлены как различными цитокинами, так и активными радикалами кислорода. Выявив торможение волокнистого канцерогенеза в условиях поддержания постоянного повышенного пула и активности макрофагов в области его реализации [6] мы предположили в этом случае двоякую роль клеток макрофагального ряда.

Это возможность трансформации нормальных клеток мезотелия активными радикалами кислорода (но только ближнего окружения) и токсическое действие на трансформированные и опухолевые (мезотелиомные) клетки. Поскольку препарат «Галавит™» увеличивает функциональную активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда, можно с достаточной долей вероятности предположить, что второе и привело к полученным в данных экспериментах результатам. Как известно, мезотелиома у людей обладает резистентностью к химиотерапевтическим воздействиям, поэтому поиск путей ее лечения, несмотря на редкость возникновения, является достаточно важным.

Поскольку препарат «Галавит™» разрешен к медицинскому применению и зарекомендовал себя с положительной стороны при использовании в лечении ряда онкологических заболеваний, возможно следует попытаться ввести его в схему лечения и мезотелиальных опухолей. Основанием для этого являются представленные результаты и данные наших других работ [5–7; 10].

Выводы

1. Препарат «Галавит™» оказал выраженное протективное действие на рост перевивной мезотелиомы плевры у крыс *Wistar*, почти полностью его тормозя.
2. Учитывая позитивное действие препарата «Галавит™» при комплексном лечении ряда онкологических заболеваний и резистентность к химиотерапии мезотелиальных опухолей, целесообразно предпринять попытку введения препарата «Галавит™» в схему лечения последней, используя уже применяемые схемы при комплексном лечении опухолей других локализаций.

Литература

1. Иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства Галавита. – Галавит. Клиническое использование и механизмы действия / Под ред. член-корр РАМН Подколзина А.А., Гришаевой Т.И. – М.: Внешторгиздат, 2002. – С. 6–14.
2. Киселев С.М., Лабурдова Е.В., Козлов А.М. Влияние препарата «Галавит» на инвазивную активность опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 61–65.
3. Коробкова Л.И., Вельшер Л.З., Германов А.Б. и др. Роль иммуномодулятора «Галавит» в онкологической и хирургической практике // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 87–92.
4. Любина Л.В., Зяблицкий В.М., Романовская В.Н. и др. Влияние Галавита на рост и метастазирование карциномы Льюиса В16. – Галавит в эксперименте и клинике. – М.: Медикор, 1998. – С. 33–5.
5. Пылев Л.Н., Васильева Л.А., Стадникова Н.М., Смирнова О.В. Макрофаги в асбестовом канцерогенезе // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50, № 6. – С. 678–682.
6. Пылев Л.Н., Смирнова О.В., Васильева Л.А. Введение пептона тормозит асбестовый канцерогенез в брюшной полости крыс // Гигиена и санитария. – 2009. – № 1. – С. 65–7.
7. Фуралев В.А., Кравченко И.В., Васильева Л.А., Пылев Л.Н. Цитотоксическое действие макрофагов и асбеста на трансформированные клетки мезотелия крысы // Бюлл. экпер. биол. и мед. – 2002. – Т. 133, № 1. – С. 84–6.
8. Хохлов А.П., Калужин О.В., Абидов М.Т. Влияние Галавита на рост и метастазирование мышинной меланомы В16. – Галавит в эксперименте и клинике. – М.: Медикор, 1998. – С. 32.
9. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Петров В.Н. и др. In vivo и in vitro индуцируемые эффекты Галавита на хемилюминесцентную активность мононуклеаров крови онкологических и неонкологических больных // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 44–9.
10. Kravchenko I.V., Furalyov V.A., Pylev L.N. Factors secreted by peritoneal macrophages are cytotoxic for transformed rat pleural mesothelium and mesothelioma cells // Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis. – 2003. – Suppl 1. – P. 207–14.

УДК 616.33-006.6-036:611.13/.16.018:57.088

А.Ф. Лазарев¹, В.В. Климачев², В.Т. Зорькин², И.П. Бобров², А.М. Авдалиан¹**ОСОБЕННОСТИ МАРКЕРОВ Ki-67, PCNA, P53 И АКТИВНОСТИ НЕОАНГИОГЕНЕЗА В ПРОГНОЗЕ РАКА ЖЕЛУДКА**¹Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Барнаул²Кафедра патологической анатомии АГМУ, Барнаул**Контактная информация:**

Зорькин Вячеслав Тимофеевич, заведующий патологоанатомическим отделением МУЗ «Городская больница № 8»

адрес: 656006, Барнаул, ул. Лазурная, 47, кв. 197; тел. +7(913)360-30-25;

e-mail: slava-zorkin@yandex.ru

Статья поступила: 10.01.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

В целях повышения эффективности прогноза послеоперационной выживаемости больных раком желудка исследованы индексы мечения иммуногистохимических маркеров Ki-67, PCNA, p53 и активность неоангиогенеза. Проведено клинико-морфологическое обследование 68 пациентов, оперированных по поводу рака желудка и наблюдаемых в течение 12 лет, что дало возможность оценить 5-летнюю выживаемость.

Показано, что выживаемость больных была статистически значимо выше при низкой экспрессии Ki-67 (менее 50 %) и PCNA (менее 60 %) ($p < 0,05$). Не выявлено влияния на длительность послеоперационной выживаемости больных экспрессии p53 и плотности внутриопухолевых микрососудов.

Ключевые слова: рак желудка, Ki-67, PCNA, прогноз.A.F. Lazarev¹, V.V. Klimachev², V.T. Zorkin², I.P. Bobrov², A.M. Avdalian¹**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF Ki-67, PCNA, P53****AND NEOANGIOGENESIS IN STOMACH CANCER**

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

Altai State Medical University, Barnaul

Abstract

In order to increase the efficiency of forecasted postoperative survivability of stomach cancer patients, the expression of Ki-67, PCNA, p53 proteins was tested immunohistochemically. We have also studied the neoangiogenesis of tumor. To estimate the 5-years survival, a clinicopathologic study of 68 patients operated with respect to stomach cancer and follow up during 12 years was performed.

We have observed that the survivability of patients was significantly higher if the expression of Ki-67 was low (less than 50 %) and PCNA (less than 60 %) ($p < 0,05$). No influence of p53 expression and density of intratumoral microvessels on postoperative survivability have been identified.

Key words: gastric cancer, Ki-67, PCNA, forecasted.**Введение**

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта населения России рак желудка устойчиво занимает 2 место, а результаты его лечения неудовлетворительны [3]. Хирурги и онкологи в своей клинической практике часто сталкиваются с таким течением болезни, которое не может быть полностью объяснено обычно используемыми классическими клинико-морфологическими критериями. Опухоли желудка одинакового размера, одной стадии заболевания и подвергшиеся аналогичному лечению могут иметь различный прогноз.

Поэтому в настоящее время большое внимание уделяется именно разработке критериев прогноза при раке желудка, к которым можно отнести биомолекулярные маркеры Ki-67, PCNA, p53 и уровень ангиогенеза в раке желудка [4; 5; 8; 9; 11; 12; 14–19]. В найденных нами литературных источниках данные о прогностическом значении изучаемых нами маркеров и уровня ангиогенеза в раке желудка неоднозначны [6; 11–17; 19].

Наиболее важными прогностическими характеристиками для злокачественных новообразований желудка являются глубина инвазии, наличие мета-

стазов в регионарных лимфатических узлах и стадия процесса [7]. Данные характеристики напрямую связаны с пролиферативной активностью опухоли. Другим значимым прогностическим фактором является гистологический тип опухоли.

Особенности маркеров Ki-67, PCNA, p53 и уровня ангиогенеза в прогнозе рака в зависимости от гистологического строения опухоли были рассмотрены нами ранее [4; 7].

Целью данного исследования явилось изучение роли антигенов Ki-67, PCNA, гена p53 и активности опухолевого неоангиогенеза в прогнозировании РЖ.

Материалы и методы

В ретроспективное иммуногистохимическое исследование вошли препараты 68 больных с диагнозом РЖ, проходивших лечение в отделениях абдоминальной хирургии государственного учреждения здравоохранения «Алтайский краевой онкологический диспансер» г. Барнаула (главный врач А.Ф. Лазарев) в 1997–2002 гг. Все необходимые клинические данные были получены при изучении медицинской документации и при динамическом наблюдении за пациентами.

Затем отмечали данные о дате и причине смерти или времени последней явки больных, на основании которых определяли 5-летнюю выживаемость¹. Иммуногистохимическое исследование выполняли на опухолевой ткани желудков, удаленных во время первичного хирургического вмешательства без предшествующих лечебных воздействий. Для оценки стадии процесса использовали Международную классификацию по системе TNM (UICC–IUAC, Wiley-Liss, 6th Edition, 2002) [2] и гистологическую классификацию ВОЗ 2000 [10], так как они являлись современными на период лечения исследуемых больных.

Иммуногистохимическому исследованию подвергали парафиновые срезы ткани, фиксированные в 10 %-ном забуференном формалине. Гистологические срезы толщиной 4 мкм депарафинизировали в толуоле.

Изучение уровня экспрессии Ki-67 проводили с использованием поликлональных антител (MIB 1), а для оценки экспрессии PCNA и p53 – моноклональных антител (PC 10 и DO 7, DAKO LSAB^R Kits, Дания).

Подсчет числа меченых клеток, приходящихся на 900–1100 всех опухолевых клеток, осуществляли в неперекрывающихся полях зрения в участках максимального мечения только в самых активных участках опухоли без дистрофических и некротических изменений.

Опухоли признавались как «маркер-позитивные», если было выявлено отчетливое ядерное окрашивание. Индекс мечения (ИМ) клеток маркерами определяли по формуле:

$$ИМ = \frac{\text{маркер}^+ \text{клетки} \times 100}{\text{опухолевые} \cdot \text{клетки}}$$

При изучении внутриопухолевой неоваскуляризации использовали такой критерий, как количество внутриопухолевых микрососудов (ВОМС) на единицу площади одного поля зрения при увеличении микроскопа в 1000 раз (объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$, площадь одного поля зрения 0,105 мм²) на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином с применением морфометрической сетки Автандилова [1] и при окрашивании маркером CD 31 (JC 70A, Bio Genix, США) [13; 17].

Всю полученную информацию вносили в специально созданную базу данных.

Обработку полученного массива информации проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.

Значимость между средними величинами и независимыми переменными оценивали с помощью t-test и считали статистически значимой, если значение «р» было менее или равно 0,05, а значение критерия t Стьюдента – 2 или более 2.

Выживаемость больных определяли с помощью метода Каплана-Майер. Достоверность различий выживаемости подтверждали по Cox'F-Test.

Оценку силы и значимости связи между выявленными факторами прогноза определяли методом корреляционного многофакторного анализа. Для сравнения качественных признаков использовали критерий χ^2 .

¹Выживаемость – это количество (процент от исходного) больных, оставшихся в живых через определенный срок с момента операции в абсолютных цифрах и процентах.

Результаты и обсуждение

Для достижения поставленной цели было необходимо решить ряд задач:

- выбор критериев прогноза,
- выявление основных предикторов прогноза и их пороговых значений,
- определение выживаемости больных в зависимости от числа сверхпороговых значений маркеров в опухоли
- оценку прогностического значения маркеров согласно стадиям по системе TNM.

Характеристика больных

Средний возраст больных составил 58,5 $\pm$ 1 лет (от 38 до 79). Срок наблюдения – в среднем 48,1 $\pm$ 2 мес. (от 0,3 до 111 мес.; от 12 до 3380 дней). После лечения менее 1 года прожили 15 больных (22 % от всех изученных случаев), пережили 1 год 53 больных (77,8 %), 3 года – 37 (54,4 %) и 5 лет – 21 больной (30,9 %).

Критерии прогноза

Нами были выбраны две максимально различающиеся по выживаемости группы больных.

1 группа представлена больными, имеющими самый непродолжительный период жизни после операции, умершими от основного заболевания в течение первого года.

2 группа – больные, имеющие наиболее продолжительный период жизни после операции (5 и более лет). Прогностическую значимость оценивали с помощью критериев χ^2 , t и p.

Выявление основных предикторов прогноза

При анализе параметров в этих группах статистически значимые различия обнаружены в уровне экспрессии маркеров Ki-67 (p=0,02) и PCNA (p=0,01). Уровень экспрессии данных маркеров был выше в группе больных с непродолжительным периодом жизни после операции.

ИМ Ki-67 достигал 56,5% $\pm$ 5,6 (рис. 1а), ИМ PCNA – 74,9% $\pm$ 3,9 (рис. 2а). У больных с продолжительным послеоперационным периодом жизни ИМ Ki-67 уменьшался до 42,6% $\pm$ 4,4 (рис. 1б), ИМ PCNA – до 62,4% $\pm$ 4,4 (рис. 2б).

В нашем исследовании не было обнаружено статистически значимых различий между данными группами в уровне экспрессии мутированного гена-супрессора p53 (p=0,7) и плотности микрососудов (p=0,7). Таким образом, выявлены два наиболее значимых предиктора прогноза: ИМ Ki-67 и ИМ PCNA.

Определение прогностически значимых количественных порогов исследуемых параметров

После анализа выживаемости больных нами были определены «разграничительные точки» (*cut-off points*) – пороги значений ИМ маркеров и ВОМС (округленные значения медиан), при переходе за пределы которых прогноз значительно ухудшался.

Для маркера Ki-67 таковым было принято значение ИМ, равное 50 %. Для маркеров PCNA и p53 – 60 %. Для ВОМС – 3 микрососуда на 0,1 мм².

Далее все изученные образцы раковых опухолей желудка были разделены нами на группы, в одних из которых оказались карциномы с минимальными значениями изучаемых параметров (ниже установленных порогов), в других – карциномы с максимальными их значениями (выше установленных порогов).

Для этих групп при прямом анализе выживаемости была определена 5-летняя выживаемость и общие тенденции выживаемости в виде функции выживания (по Каплан-Майер с применением актуального способа просчитывания; рис. 3а–г).

При анализе зависимости прогноза РЖ от ИМ Ki-67 выявлено стойкое снижение 5-летней выживаемости по мере увеличения ИМ Ki-67. Лучший прогноз был в тех случаях, когда ИМ Ki-67 не превышал 50%, а 5-летняя выживаемость достигала $48,4\% \pm 9$. При увеличении ИМ Ki-67 свыше 50% выявлено заметное снижение 5-летней выживаемости до $21,4\% \pm 7,9$.

Регрессионный анализ выживаемости по Коксу выявил высокую прогностическую значимость ИМ Ki-67 ($\chi^2=8,7$; $t=2,9$; $p=0,003$). Графическое отражение анализа по Каплан-Майер, представленное на рис. 3а наглядно продемонстрировало различия прогноза: когда ИМ Ki-67 был меньше 50%, к 1826 дню (5 лет) после операции кумулятивная доля выживших составила 0,59; когда ИМ Ki-67 был больше 50%, доля выживших была равна 0,27.

При изучении экспрессии PCNA лучший прогноз был в тех случаях, когда ИМ PCNA не превышал 60%, а 5-летняя выживаемость достигала $52,6\% \pm 11,8$. При увеличении ИМ PCNA свыше 60% выявлено заметное снижение 5-летней выживаемости до $27,5\% \pm 7,1$. Статистическая значимость полученных данных не вызывала сомнений – при регрессионном анализе выживаемости по Коксу для маркера PCNA получены следующие результаты значимости параметра: $\chi^2=6,9$; $t=2,5$; $p=0,009$. Графическое отражение двухвариантного анализа по Каплан-Майер наглядно продемонстрировало изменение пропорций выживаемости при различных вариантах ИМ PCNA (см. рис. 3б). Кумулятивная доля выживших к 1826 дню (5 лет) после операции при ИМ PCNA < 60% составила 0,75; для пациентов с ИМ PCNA $\geq 60\%$ – 0,3. Таким образом, регрессионный анализ выживаемости по Коксу подтвердил прогностическую значимость основных предикторов прогноза.

ИМ p53 не оказывал значимого влияния на прогноз выживаемости. При ИМ p53 < 60% 5-летняя выживаемость достигала $34,1\% \pm 7,2$, а при ИМ p53 $\geq 60\%$ – $40\% \pm 13,1$.

При регрессионном анализе значимости параметра по Коксу для маркера p53 получены следующие результаты: $\chi^2=0,03$; $t=0,2$; $p=0,9$. Графическое отражение двухвариантного анализа Каплан-Майер продемонстрировало изменение пропорций выживаемости при различных вариантах ИМ p53 (см. рис. 3в). Кумулятивная доля выживших к 1826 дню (5 лет) при ИМ p53 < 60% составила 0,42; при ИМ p53 $\geq 60\%$ повышалась до 0,53.

По данным васкуляризации опухоли 5-летняя выживаемость при BOMC < 3 достигала $44\% \pm 10,1$, а при BOMC ≥ 3 снизилась до $29,4\% \pm 7,8$. Регрессионный анализ значимости параметра по Коксу не выявил статистической значимости для внутриопухолевой плотности микроциркуляторного русла: $\chi^2=1,8$; $t=1,3$; $p=0,2$.

Двухвариантный анализ Каплан-Майер выявил изменение пропорций выживаемости при различных вариантах BOMC (см. рис. 3г). Кумулятивная доля выживших к 1826 дню (5 лет) при BOMC < 3 составила 0,61; при BOMC ≥ 3 доля выживших снижалась до 0,31.

Сопоставление суммы сверхпороговых значений маркеров с выживаемостью больных, глубиной инвазии и регионарным метастазированием.

Следующим этапом нашего исследования стало выяснение значимости для прогноза выживаемости сочетания нескольких сверхпороговых значений изучаемых параметров в опухолях одних и тех же больных. Все 68 пациентов были поделены на 5 групп:

в группу 0 вошли все случаи, в которых ни один из параметров не превышал установленного нами порогового значения (7 случаев, 10,3 %),

в группу 1 вошли случаи с одним сверхпороговым значением параметра (13 случаев, 19,1 %),

в группу 2 соответственно этой логике – с двумя таковыми значениями (28 случаев, 41,2 %),

в группу 3 – с тремя (12 случаев, 17,6 %),

в группу 4 вошли случаи, в которых все параметры имели значения, превышающие порог условно неблагоприятного значения (8 случаев, 11,8 %).

Мультивариантный анализ Каплан-Майер наглядно продемонстрировал различия между ними (см. рис. 3д). Регрессионный анализ выживаемости по Коксу при этом выявил высокую статистическую значимость совокупности сверхпороговых параметров ($\chi^2=15,2$, $t>2$, $p=0,004$). Для группы 0 кумулятивная доля выживших к 1826 дню (5 лет) и к моменту максимального дожития (9,3 года) после операции составила 0,8. Для группы 1 равнялась 0,82. В группе 2 – 0,37. Для группы 3 составила 0,3. Для группы 4 были выявлены самое низкое значение кумулятивной доли выживших – 0,12.

В группе больных с непродолжительным периодом жизни после операции значимо чаще ($t=2,6$) наблюдали 2 сверхпороговых параметра (это было сочетание PCNA и BOMC) или 4, реже – 1 (p53), и никогда не отмечали сочетания 4 допороговых значений. У большинства больных с непродолжительным периодом послеоперационной жизни находили сверхпороговое значение основных предикторов прогноза (ИМ PCNA – в 80 % случаев, ИМ Ki-67 – в 60 % случаев).

Напротив, в группе больных с продолжительным послеоперационным периодом жизни никогда не наблюдали 4 сверхпороговых параметра вместе, чаще отмечали 2 или один; а сверхпороговые значения основных предикторов прогноза регистрировали у меньшего количества больных (ИМ PCNA – в 52 % случаев, ИМ Ki-67 – в 29 % случаев), но данные не были статистически значимыми ($t=1,5$).

Из 68 рассмотренных данных в 12 случаях был диагностирован т.н. «кранний» РЖ (карцинома с локализацией в пределах слизистой оболочки, что, согласно 5 изданию классификации TNM, соответствует pTis, и/или подслизистого слоя – pT1). Причем 9 из них имели продолжительный период жизни после операции, остальные 3 пережили только 3-летний рубеж.

В таких опухолях преимущественно ($t=3$) отмечали 1 сверхпороговый параметр (тогда им был ИМ p53) или ни одного, и никогда – сочетание 4 сверхпороговых параметров; сверхпороговые значения основных предикторов прогноза регистрировали у небольшого количества больных (ИМ PCNA – в 25 % случаев, ИМ Ki-67 – в 8 % случаев).

В местнораспространенных опухолях с инвазией мышечной оболочки и за ее пределы (T2–4) значимо чаще ($t=5,2$) отмечали 2 или 3 сверхпороговых параметра одновременно (это было сочетание PCNA, BOMC и Ki-67), крайне редко – ни одного; а сверхпороговые значения основных предикторов прогноза находили у большого количества больных (ИМ PCNA – в 75 % случаев, ИМ Ki-67 – в 50 % случаев).

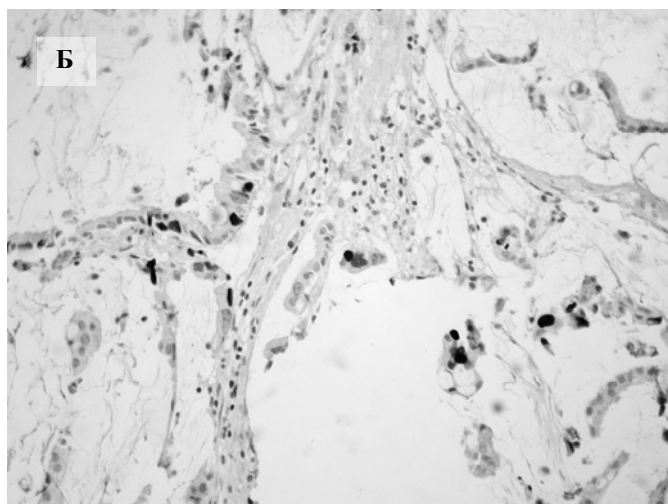
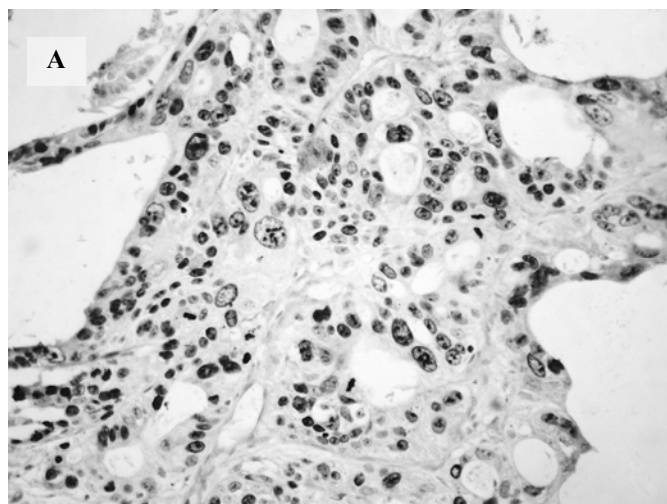


Рис. 1. Световая микроскопия. Увеличение $\times 400$.
Иммуногистохимическое окрашивание. Экспрессия онкогена Ki-67 в РЖ:
А – при ИМ Ki-67 $> 50\%$;
Б – при ИМ Ki-67 $< 50\%$.

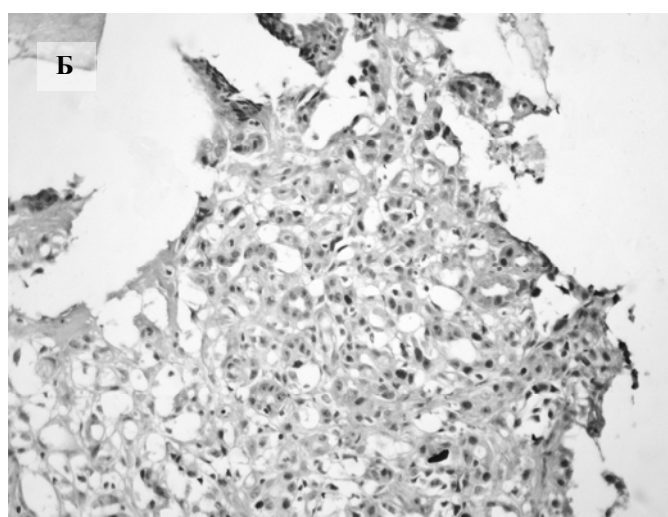
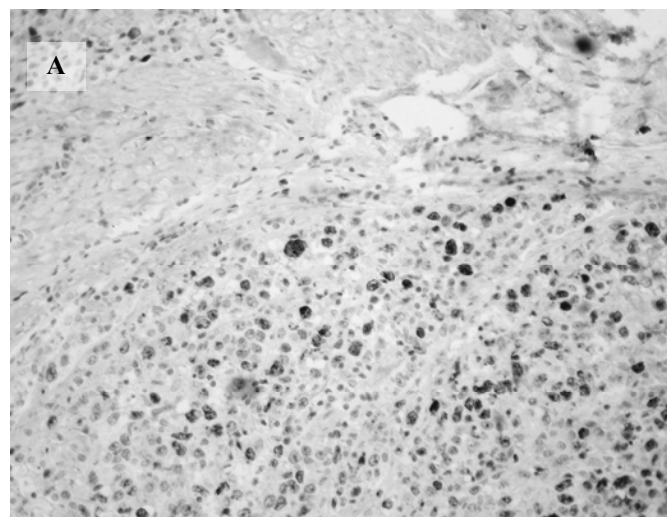


Рис. 2. Световая микроскопия. Увеличение $\times 400$.
Иммуногистохимическое окрашивание. Экспрессия онкогена PCNA в РЖ:
А – при ИМ PCNA $> 60\%$;
Б – при ИМ PCNA $< 60\%$.

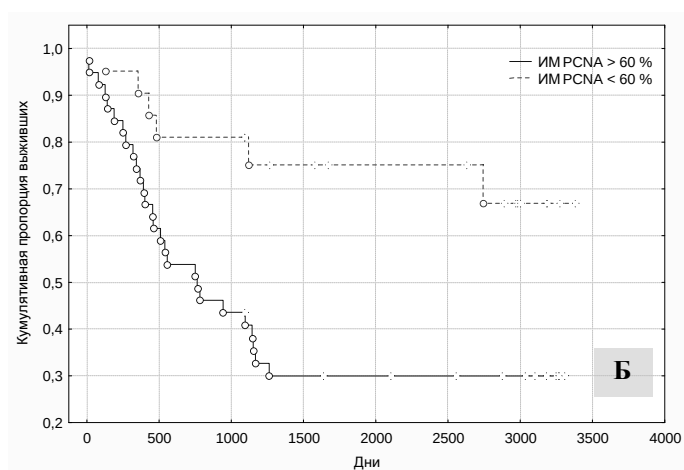
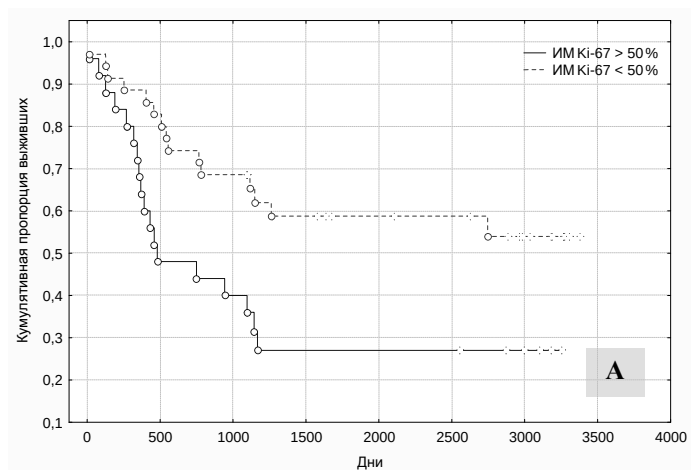


Рис. 3. Регрессионные модели (по Каплан-Мейеру) кумулятивной доли выживших среди больных РЖ при исследовании:
А – ИМ Ki-67;
Б – ИМ PCNA;

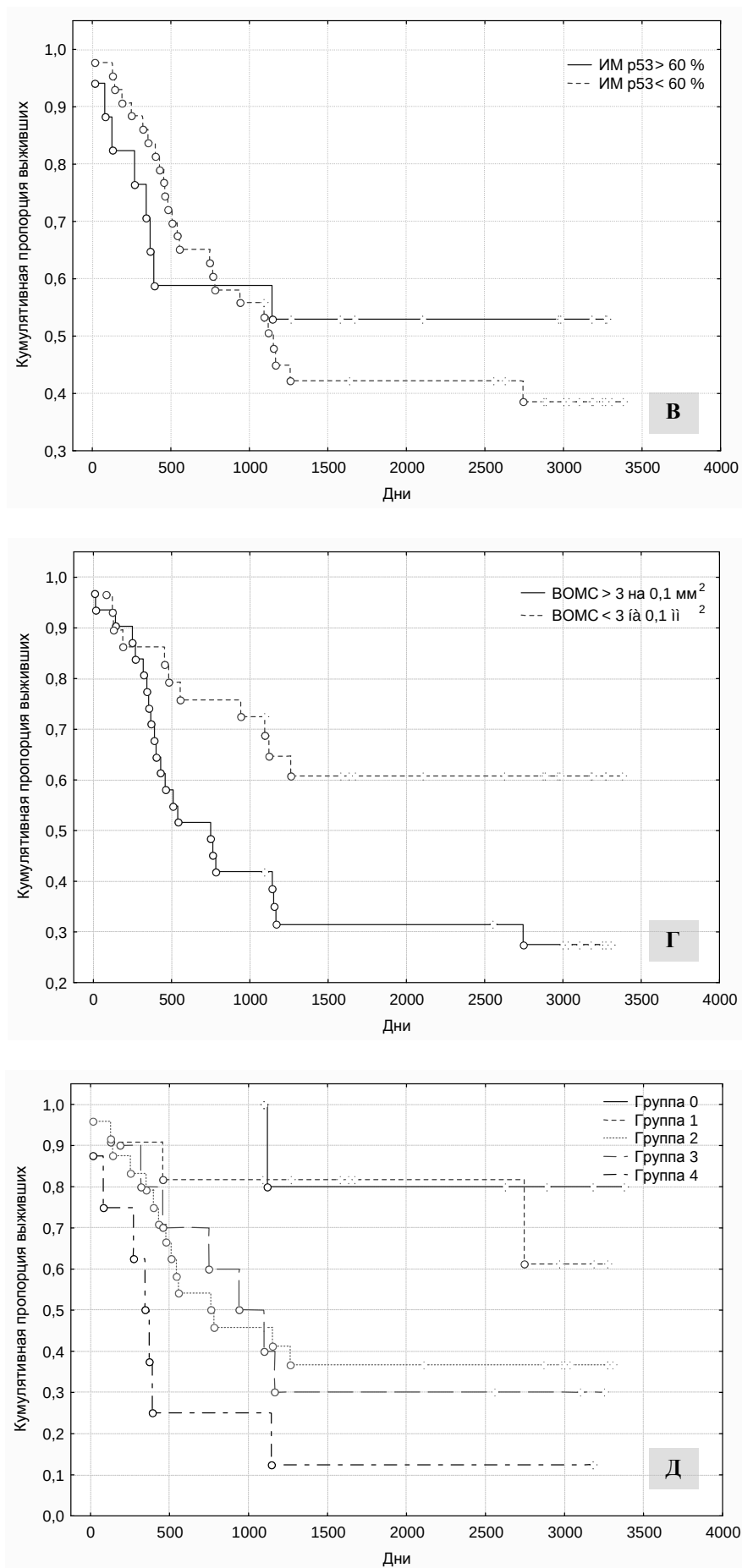


Рис. 3. Регрессионные модели (по Каплан-Мейеру) кумулятивной доли выживших среди больных РЖ при исследовании:
 В – IM p53;
 Г – BOMC;
 Д – количества сверхпороговых параметров.

Отличия были обнаружены между карциномами с метастазами в регионарных лимфатических узлах и опухолями без метастазов.

При отсутствии метастазов (30 случаев) значимо чаще ($t=2,6$) выявляли 1 ($p53$), 2 (PCNA и $p53$) или ни одного сверхпорогового параметра, крайне редко – сочетание 4; а сверхпороговые значения основных предикторов прогноза регистрировали у небольшого количества больных (ИМ PCNA – в 40% случаев, ИМ Ki-67 – в 27% случаев). У 38 больных были найдены метастазы в регионарных лимфатических узлах.

В этих случаях наиболее часто ($t=5,1$) сверхпороговых величин достигали 2 или 3 параметра (это было сочетание BOMC, PCNA и Ki-67), крайне редко – 1 ($p53$), и никогда – ни одного; сверхпороговые значения основных предикторов прогноза отмечали у значительного количества больных (ИМ PCNA – в 91% случаев, ИМ Ki-67 – в 60% случаев).

В группе 1 значимо чаще ($t=2,8$) преобладал сверхпороговый ИМ $p53$, редко – BOMC и никогда – Ki-67.

В группе 2 значимо чаще ($t=3,5$) обнаруживали сверхпороговые ИМ PCNA и BOMC, редко – $p53$.

В группе 3 сверхпороговыми были ИМ Ki-67, PCNA и BOMC, и никогда – $p53$.

Среди всех 68 изученных случаев сверхпороговые значения ИМ PCNA и BOMC встречались в 2 раза чаще ($t=3,4$), чем $p53$ и Ki-67.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – С. 290.
2. Виттекинд Ч., Грин Ф.Л. TNM Атлас. Иллюстрированное руководство по TNM/pTNM классификации злокачественных опухолей. 5-е издание, 2004, под ред. Ганцева Ш.Х. – М.: МИА, 2007. – С. 86–89.
3. Давыдов М.И., Заридзе Д.Г., Лазарев А.Ф. и др. Анализ причин смертности населения России // Вестник Российской АМН. – 2007. – № 7. – С. 17–27.
4. Зорькин В.Т., Лазарев А.Ф., Климачев В.В. и др. Взаимосвязь неоваскуляризации и пролиферативной активности в недифференцированном раке желудка с метастазами в регионарных лимфатических узлах // Современные проблемы клинической цитоморфологии. Тезисы Всероссийской конференции с международным участием, посвященные памяти член-корр. РАМН, з.д.н. РФ, профессора Олега Константиновича Хмельницкого и 25-летию цитологии кафедры патологической анатомии СПб МАПО. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 37–8.
5. Зорькин В.Т., Лазарев А.Ф., Климачев В.В. и др. Особенности экспрессии иммуногистохимического маркера Ki-67 в прогнозе рака желудка // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием 9–10 октября 2009г. «100-летие Российского общества патологоанатомов». – С.-Петербург, 2009. – С. 130–1.
6. Колобаев И.В. Выбор объема лимфаденэктомии при раннем раке желудка. Авторефер. дисс. ... канд. мед. наук [Электронный ресурс] / ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена» Росмедтехнологий. – Электронные данные. – М., 2009. – Заглавие с экрана. – Режим доступа: <http://www.mnioi.ru/25/15/330>
7. Лазарев А.Ф., Климачев В.В., Зорькин В.Т. и др. Роль биомолекулярных онкогенов в оценке местной распространенности рака желудка // Проблемы клинической медицины. – Барнаул. – 2006. – 2(6). – С. 30–5.
8. Лазарев А.Ф., Климачев В.В., Зорькин В.Т. и др. Роль антигенов Ki-67, PCNA и гена-супрессора $p53$ в определении прогноза рака желудка (РЖ) // Материалы Российской научно-практической конференции с международным участием 24–25 июня 2008 г. под ред. Лазарева А.Ф. «Совершенствование онкологической помощи в современных условиях». – Барнаул. – 2008. – С. 113–5.
9. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Иммуногистохимическая диагностика опухолей слюнных желез, пищевода, желудка, толстой кишки, печени. Петров С.В., Райхлин Н.Т. (ред.). Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – 3-е изд., доп. и перераб. – Казань: Титул, 2004. – С. 68–75.
10. Hamilton S.R., Aaltonen L.A. Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System. Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System. – Lyon: IARC Press, 2000. – P. 37–66.
11. Juvan R., Hudler P., Gazvoda B. et al. Significance of genetic abnormalities of $p53$ protein in Slovenian patients with gastric carcinoma // Croat. Med. J. – 2007. – 48(2). – P. 207–17.
12. Kyu E.L., Hyuk-Joon L., Yoon H.K. et al. Prognostic Significance of $p53$, nm23, PCNA and c-erbB-2 in Gastric Cancer // Jap. J. of Clinical Oncology. – 2003. – 33. – P. 173–9.
13. Matsuyama K., Chiba Y., Sasaki M. et al. Tumor angiogenesis as a prognostic marker in operable non-small cell lung cancer // Ann. Thorac. Surg. – 1998. – 65. – P. 1405–9.
14. Min L.K., Noh S.M. Title Assessment of Microvessel Density and Expression of $p53$, Ki67 in Gastric Adenocarcinoma: Relationship to the Clinicopathological Parameters // J. Korean surgical society. – 2003. – 065(06). – P. 508–14.
15. Martin B., Paesmans M., Mascaux C. et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis // Br. J. Cancer. – 2004. – 91. – P. 2018–25.
16. Nitti D., Mocellin S., Marchet A. et al. Recent advances in conventional and molecular prognostic factors for gastric carcinoma // Surg. Oncol. Clin. N. Am. – 2008. – 17(3). – P. 467–83.
17. Parums D.V., Cordell J.L., Micklem K. et al. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections // J. Clin. Pathol. – 1990. – 43. – P. 752–7.
18. Ru G.Q., Zhao Z.S. mRNA expression of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor in gastric carcinoma and significance thereof // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2008. – 88(29). – P. 2030–5.
19. Tenderenda M. Potential prognostic value of angiogenesis, cell proliferation and metastasing in patients with surgically treated gastric cancer-current knowledge // Wiad. Lek. – 2006. – 59(11–12). – P. 855–60.

Таким образом, в опухолях с наименее благоприятными характеристиками (большой глубиной инвазии, наличием регионарных метастазов, прожившие менее 1 года после операции) чаще наблюдали 2 и 4 сверхпороговых параметра, среди которых преобладали показатели ИМ PCNA и BOMC, редко – $p53$. В опухолях с более благоприятными характеристиками (ранний РЖ, отсутствие регионарных метастазов, пережившие 5 и более лет после операции) либо не было сверхпороговых величин, либо определяли высокие значения ИМ $p53$, реже – Ki-67 и BOMC.

Выводы

1. Маркеры Ki-67 и PCNA имеют значимую связь с выживаемостью больных раком желудка. Уровень экспрессии маркеров Ki-67 и PCNA значимо выше в группе с непродолжительным периодом жизни после операции по сравнению с больными с продолжительным периодом послеоперационной жизни.
2. Из числа изученных маркеров можно выделить два наиболее значимых предиктора прогноза: Ki-67 и PCNA. 5-летняя выживаемость была выше, когда ИМ Ki-67 не превышал порог 50 %, ИМ PCNA – 60 %.
3. Больные с наибольшим количеством сверхпороговых значений изученных маркеров имеют наименьшую вероятность длительной послеоперационной выживаемости.

УДК 616.345/.351-006.6-033.2:616.36:577.21

О.И. Каганов¹, Н.Е. Торопова², С.В. Козлов¹**КОНТРОЛЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫПОЛНЕНИЯ РАДИОЧАСТОТНОЙ АБЛАЦИИ КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ МЕТАСТАЗОВ ПЕЧЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОНКОМАРКЕРОВ**¹ГО ВПО Самарский государственный медицинский университет Росздрава²ГУЗ Самарский областной клинический онкологический диспансер**Контактная информация:**

Каганов Олег Игоревич, ассистент кафедры онкологии

адрес: 443110, Самара, проспект Ленина, д. 8, кв. 27; тел. +7(905)017-52-33;

e-mail: okaganov@yandex.ru

Статья поступила: 12.04.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

Цель настоящей работы заключалась в оценке возможности применения онкомаркеров (ОМ) РЭА, СА 19-9, СА 242 для контроля эффективности радиочастотной абляции (РЧА) метастазов печени у больных с диагнозом «колоректальный рак» (КРР). В исследование включено 60 пациентов, которым была выполнена радикальная операция на толстой кишке по поводу КРР. У всех больных в различные сроки диспансерного наблюдения (в среднем через 15,18±6,09 мес.) после хирургического лечения выявлена прогрессия онкопроцесса в виде появления метастазов в печени, что явилось показанием к РЧА. Исследования ОМ проводилось до РЧА и через 1; 3; 6 и 12 мес. после операции. Установлено, что определение уровней РЭА, СА 19-9, СА 242 может быть использовано для контроля полноты выполнения РЧА метастазов печени и раннего выявления рецидива опухолевого процесса у больных с КРР.

Ключевые слова: радиочастотная абляция, метастазы колоректального рака, онкомаркеры.O.I. Kaganov¹, N.E. Toropova², S.V. Kozlov¹**THE ROLE OF ONCOMARKERS IN MONITORING****THE METASTASES IN LIVER IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER AFTER RFA**¹State Medical University, Samara²Region Clinic of Oncology, Samara**Abstract**

The purpose of this study was to assess the possibility of using oncomarkers (OM) CEA, CA 19-9, CA 242 involvement in monitoring the efficacy of the radiofrequency ablation (RFA) of livers' metastases in patients with colorectal cancer (CRC). 60 patients were enrolled in this study. Patients were undergo radical operation on colon. The progress of oncoprocess such as new livers' metastases was revealed in all patients during of dispensary observation (15.18±6.09 month) after surgical treatment. This approach could be an indication to RFA. The identification of OM was performed before RFA and in 1, 3, 6 and 12 month after operation. The determination of CEA, CA 19-9, CA 242 levels can be successfully used to control the radiofrequency ablation of liver metastases and to diagnose the early detection of recurrence in patients with CRC.

Key words: radiofrequency ablation, metastases of colorectal cancer, oncomarker.**Введение**

Последнее время заболеваемость раком толстой кишки неуклонно растет. В России ежегодно заболевают 23 000 человек раком ободочной и 17 000 раком прямой кишки [2]. Наиболее часто злокачественные новообразования толстой кишки метастазируют в печень. В последние годы резко увеличилось количество больных с IV стадией КРР [6]. Основным путем проникновения метастазов в печень служит гематогенный, по системе воротной вены [4]. Метастазы в печени могут определяться как во время удаления первичной опухоли, так и выявляться в различные сроки после ее удаления. Ко времени установления диагноза метастазы в печени выявляются у 30 % больных, еще у 20–40 % – после хирургического лечения первичной опухоли толстой кишки [8]. В лечении данной группы больных активно применяется метод радиочастотной абляции (РЧА) [1].

РЧА метастазов печени является малоинвазивным методом локальной деструкции, основанным на колебании заряженных частиц (диполей) при воздействии радиочастотных волн, вследствие чего

возникает нагревание в патологических тканях, приводящее к сухому коагуляционному некрозу в области патологического очага [5]. Контроль полноты выполнения РЧА, а также контроль раннего выявления колоректальных метастазов является важным этапом лечения. В качестве основных методов исследования данной группы больных является УЗИ, КТ и МРТ брюшной полости [1; 5].

В последнее время начал активно применяться метод определения опухолеассоциированных маркеров (ОМ). Известно, что развитие злокачественных опухолей сопровождается гиперэкспрессией и высвобождением опухолеассоциированных антигенов, которые удается обнаружить в периферической крови [3]. Избыточная или эктопическая экспрессия таких антигенов является не только маркером развития опухоли, но и структурной предпосылкой малигнизации, эволюции и прогрессии опухоли. В настоящее время в клинической практике у больных КРР для оценки эффективности терапии широко проводится исследование РЭА [11]. Этот протеин локализован в цитоплазме опухолевых клеток, которые интенсивно секретируют его во внеклеточное пространство.

Известно, что РЭА играет роль в межклеточном взаимодействии и адгезии, клеточной дифференцировке, усилении метастазирования [10]. Детально изучается взаимодействие между РЭА и факторами роста, протоонкогенами и тумор-супрессорными генами в канцерогенезе.

Биологический период полужизни РЭА – 14 дней. Это означает, что спустя 2 недели после эффективного лечения уровень этого маркера должен сократиться вдвое [12].

СА19-9 общепризнан как маркер выбора при раке поджелудочной железы и гепатобилиарной карциноме, является в настоящее время вторым по важности маркером мониторинга колоректальных карцином. Гликолипидный онкофетальный антиген СА 19-9 является компонентом многих клеток слизистой оболочки, биологический период его полужизни равен 5 дням [7].

Гликопротеидный антиген СА242 также активно используется для мониторинга состояния больных колоректальным раком в послеоперационном периоде. Серийные определения СА242 позволяют выявлять развитие рецидивов за 5–7 мес. до их клинической манифестации [9].

Целью нашей работы было изучить возможность применения ОМ – РЭА, СА19-9, СА242 для диагностики и проведения контроля эффективности РЧА колоректальных метастазов печени.

Материалы и методы

В программу исследования вошли 60 больных. Пациенты с диагнозом КРР были радикально прооперированы в 2002–2008 гг.

Локализация:

- слепая кишка – 7 пациентов,
- восходящий отдел ободочной кишки – 11,
- печеночный изгиб ободочной кишки – 6,
- селезеночный изгиб ободочной кишки – 8,
- нисходящий отдел ободочной кишки – 10,
- прямая кишка – 17.
- Выполнены:
- правосторонняя гемиколэктомия – 24,
- левосторонняя гемиколэктомия – 19,
- резекция прямой кишки – 17.

При стадировании после хирургического лечения:

- 10 % – I стадия,
- 63,3 % – II стадия,
- 26,7 % – III стадия.

Морфологически у всех пациентов верифицирована аденокарцинома разной степени дифференцировки.

Все 60 больных находились на диспансерном наблюдении. В среднем через $15,18 \pm 6,09$ мес. после операции на кишке была диагностирована прогрессия онкопроцесса в виде метастазов в печень.

Клиническое обследование всех пациентов данной группы проводилось по стандартной схеме: ультразвуковое исследование брюшной полости, КТ или МРТ и верификация вторичных новообразований печени при пункционной биопсии.

При пункции метастазов во всех случаях был получен ответ «аденокарцинома», в связи с чем больные разделены на три группы по степени дифференцировки опухолей:

- G₁ (высокодифференцированная) – n=16,
- G₂ (умереннодифференцированная) – n=20,
- G₃ (низкодифференцированная) – n=24.

Так же пациентов разделили на две группы учитывая сумму максимальных диаметров метастазов печени:

- 1 – ≤ 7 см (n=36);
- 2 – > 7 см (n=24).

Всем больным была выполнена РЧА метастатических новообразований. Общее число узлов, подвергнутых РЧА, составило 158.

В программу обследования также дополнительно были включены и иммунохимические исследования ОМ: РЭА, СА19-9, СА242 до РЧА и через 1; 3; 6 и 12 мес. после операции на печени. Концентрацию ОМ определяли в сыворотке крови методом иммунохемилюминесцентного анализа с использованием анализатора Immulite 2000 (DPC, США) и тест-систем производства DPC (США) в интервалах наблюдения, указанных выше.

Оценку статистической значимости результатов исследований проводили с помощью параметрического t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия U Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что до выполнения РЧА метастазов печени индивидуальные уровни ОМ пациентов значительно превышали дискриминантные концентрации (ДК) и широко варьировали. Показатели РЭА у 98,3 % больных превышали ДК (5 нг/мл) от 2,5 до 62 раз; уровни СА 19-9 у 95 % были выше ДК (35 МЕ/мл) от 1,1 до 11,1 раз, концентрации СА242 у 96,7 % выше ДК (20 МЕ/мл) в 1,4–18,5 раз. При этом у 100 % пациентов концентрации, по крайней мере, двух ОМ были значительно выше ДК.

Выявлено также, что показатели ОМ достоверно различаются в зависимости от степени дифференцировки опухоли: чем ниже степень дифференцировки опухоли, тем выше уровни сывороточных ОМ (табл. 1; 2).

Исходные значения ОМ зависят и от суммы диаметров метастатических очагов печени. У больных, имевших сумму диаметров метастазов более 7 см, уровни РЭА на 74,2 %; СА19-9 – на 53,2 %; СА242 – на 51,4 % превышали аналогичные показатели у больных с суммой диаметров метастатической ткани менее 7 см (табл. 3).

Эффективность РЧА метастазов печени была отмечена нами уже через месяц наблюдения – регистрировалось убывание в сыворотке крови уровней ОМ (рис. 1; 2). При этом показатели РЭА сократились в среднем на 37,2 %; СА19-9 – на 41,4 %; СА242 – на 37,5 %. Через 3 мес. было выявлено достоверное снижение первоначального уровня РЭА в среднем в 3,2 раза ($p = 0,0046$); СА19-9 – в 2,8 раза ($p = 0,0083$); СА242 – в 3 раза ($p = 0,0021$). Через 6 мес. после операции уровни РЭА стали ниже первоначальных в 4,8 раза, однако все еще превышали нормальные значения.

В то же время величины СА19-9 и СА242 в среднем по группе приближались к нормальным показателям, при этом у 40,5 % пациентов уровни СА19-9 и у 31 % пациентов уровни СА242 нормализовались.

Через 12 мес. после РЧА концентрация сывороточного РЭА в среднем в группе больных достоверно сократилась в 6 раз, однако нормализацию этого показателя (до 2 нг/мл) регистрировали только у одного пациента.

Вместе с тем средние уровни СА19-9 и СА242 в этой группе больных практически соответствовали нормальным значениям, у 71 % пациентов уровни СА19-9 и у 38 % пациентов уровни СА242 через 12 мес. наблюдения стали ниже ДК.

Таблица 1

Уровни ОМ у больных с диагнозом КРР с разной степенью дифференцировки опухоли до выполнения РЧА

Онкомаркеры	Высоко-Дифференцированные G1	Умеренно-Дифференцированные G2	Низко-Дифференцированные G3
РЭА, нг/мл	45,43±26,63	88,54±13,81	110,24±84,21
СА19-9, Е/мл	114,99±84,79	145,92±3,48	201,21±95,58
СА242, Е/мл	108,38±86,56	149,50±70,93	239,21±111,67

Таблица 2

Уровни значимости различий концентраций ОМ у больных с диагнозом КРР при разной степени дифференцировки опухоли до выполнения РЧА

Онкомаркеры	Сравнение групп G1 – G2	Сравнение групп G1 – G3	Сравнение групп G2 – G3
РЭА	p = 0,0012	P = 0,0018	p = 0,0002
СА19-9	p = 0,042	p = 0,0047	p = 0,0061
СА24	p = 0,022	p = 0,00024	p = 0,0059

Таблица 3

Уровни ОМ больных с диагнозом КРР с разным объемом метастатического поражения печени до выполнения РЧА

Онкомаркеры	V mts ≤ 7 см	V mts > 7см	Значимость различий (p)
РЭА, нг/мл	57,08±39,12	99,43±81,45	p = 0,025
СА19-9, Е/мл	115,29±96,64	176,65±75,03	p = 0,0077
СА242, Е/мл	126,46±83,47	191,45±111,81	p = 0,0128

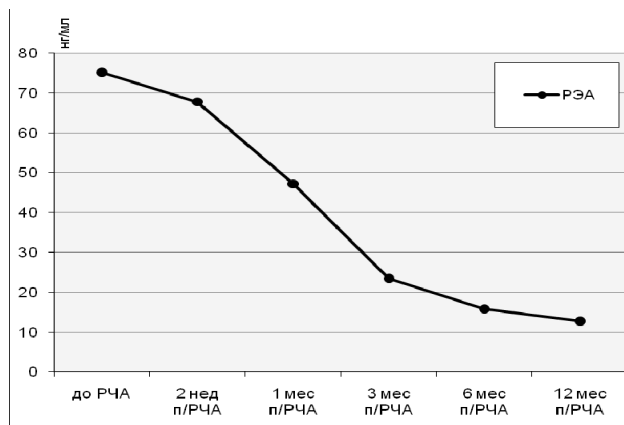


Рис. 1. Изменение уровней РЭА в сыворотке крови больных с диагнозом КРР после эффективной РЧА метастазов печени.

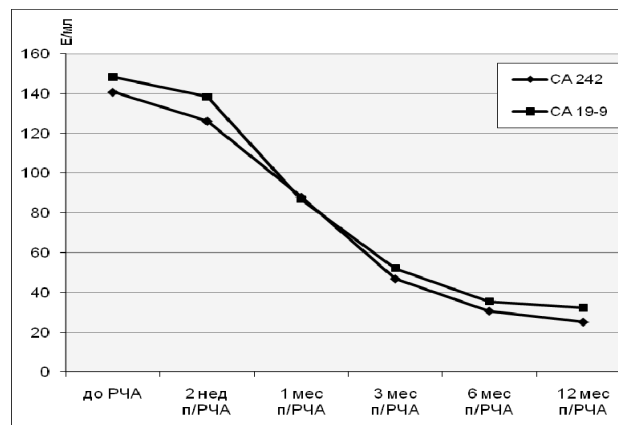


Рис. 2. Изменение уровней СА 19-9 и СА 242 в сыворотке крови больных с диагнозом КРР после эффективной РЧА метастазов печени.

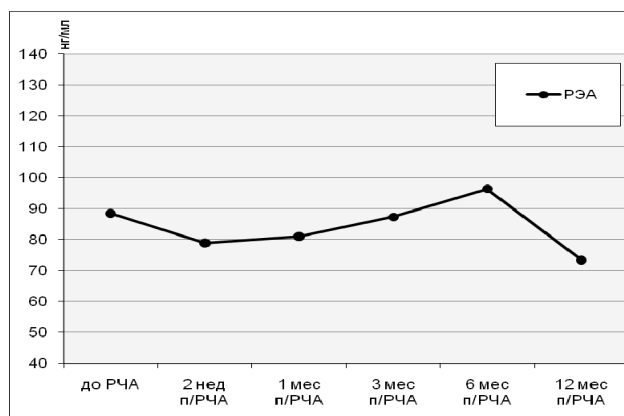


Рис. 3. Изменение уровней РЭА в сыворотке крови у больных с диагнозом КРР после РЧА метастазов печени, у которых выявлена прогрессия процесса.

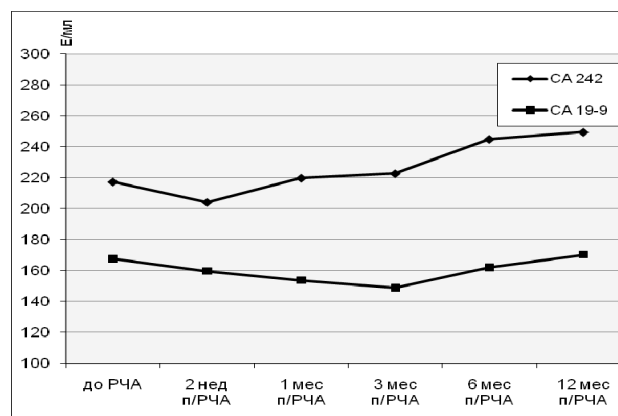


Рис. 4. Изменение уровней СА 19-9 и СА 242 в сыворотке крови у больных с диагнозом КРР после РЧА метастазов печени, у которых выявлена прогрессия процесса.

За весь период наблюдения у 18 больных была выявлена продолженная прогрессия заболевания.

Уровень РЭА за весь период наблюдения у данной группы изменялись незначительно, не давая в среднем увеличения концентрации маркера от исходной величины в течение 3 мес.

Некоторый подъем РЭА (на 9 %) отмечали через 6 мес. наблюдения (рис. 3).

Показатель маркера СА19-9 в течение первых 3 мес. имел тенденцию к снижению, что нами расценивалось, как результат позитивного действия РЧА.

Однако к 12 мес. наблюдения уровень СА19-9 практически соответствовал значению до операции. Была также отмечена тенденция к росту показателя СА242 через 3 мес. после выполнения РЧА, а к концу срока наблюдения СА242 вырос на 14,8 % (рис. 4).

Статистический анализ значимости различий в концентрациях ОМ в группах больных с безрецидивным течением и в группе где выявлен рецидив в области РЧА показал, что уже через месяц после выполнения абляции уровни РЭА, СА19-9 и СА242 достоверно ($p = 0,0017$; $p = 0,0487$; $p = 0,0093$ соответственно) различаются во всех периодах дальнейшего наблюдения.

Выводы

У больных с диагнозом КРР с метастатическим поражением печени показатели РЭА, СА19-9, СА242 в сыворотке крови зависят от степени анаплазии опухоли и размеров вторичных новообразований. Эффективность РЧА метастазов подтверждается достоверным стойким снижением концентраций ОМ с 1 по 12 мес. Дальнейшую прогрессию онкопроцесса можно прогнозировать по динамике изменения уровней РЭА, СА19-9, СА242.

Литература

1. Вишневский, В.А. Гаврилин А.В. Сергеева О.Н. Первый опыт радиочастотной абляции злокачественных новообразований печени // 10 Юбилейная международная конференция хирургов-гепатологов России и стран СНГ. – Анналы хирургической гепатологии. – 2003. – Т. 8, № 2. – С. 223–4.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных новообразований в 2006г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 19, № 2 (прил. 1). – С. 91–2.
3. Долгов В.В., Ракова Н.Г., Колупаев В.Е., Рытикова Н.С. Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях. – М.: «Триада», 2007. – С. 189–91.
4. Патютко Ю.И. Хирургическое лечение злокачественных опухолей печени. – М.: Практическая медицина, 2005. – 312 с.
5. Сергеева О.Н. Радиочастотная абляция при очаговых образованиях печени. – Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2005. – 131 с.
6. Чиссов, В.И., Старинский В.В. Состояние онкологической помощи стран СНГ. – М.: Медицина, 2000. – 216 с.
7. Gasser M., Gerstlauer C., Grimm M. et al. Comparative analysis of predictive biomarkers for therapeutical strategies in colorectal cancer // Ann. Surg. Oncol. – 2007. – 14(4). – P. 1272–84.
8. Glimelius B. Chemotherapy of colorectal cancer liver metastases // The European Cancer Conference European. Journal of Cancer. – 2003. – 1(6). – P. 173–80.
9. Kuusela P., Haglund C., Jalanko H., Roberts P. CA 242. – Sell St. (ed.). Serological Cancer Marcers. – N. Jersey: Humana Press, 1992. – P. 429–35.
10. Levy M., Visokai V., Lipska L., Topolcan O. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma // Neoplasma. – 2008. – 55(2). – P. 138–42.
11. Locker G., Hamilton S., Harris J. et al. Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer // J. Clin. Oncol. ASCO 2006 – 2006. – 24(33). – P. 5313–27.
12. Sikorska H.M., Fuks A., Gold P. Carcinoembryonic Antigen. – Sell St. (ed.). Serological Cancer Marcers. – N. Jersey: Humana Press, 1992. – P.47–97.

(окончание литературы к статье: Л.Н. Пылева и соавт. «ТОРМОЗЯЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА...»)

3. Choi J.-W., Choi N.-C., Mahendran B. et al. Sorption kinetics of aqueous benzene for attached bacteria on sorbents // Current Applied Physics. – 2007. – 7(1). – P. 13–7.
4. Davankov V., Pavlova L., Tsyurupa M. et al. Polymeric adsorbent for removing toxic proteins from blood of patients with kidney failure // J. Chromatogr. – 2000. – 739. – P. 73–80.
5. Davankov V.A., Pavlova L.A., Tsyurupa M.P., Tur D.R. Novel polymeric solid-phase extraction material for complex biological matrices. Portable and disposable artificial kidney // J. Chromatogr. – 1997. – 689. – P. 117–22.
6. Lewin A.J., Maxwell M.H. Sorbent-based regenerating peritoneal dialysis. In: Giordano C., ed. Sorbents and their clinical applications. – New York: Academic Press, 1980. – P. 353–74.
7. Mikhailovsky S.V. Emerging technologies in extracorporeal treatment: focus on adsorption // Perfusion. – 2003. – 18(1). – P. 47–54.
8. Peng Z.Y., Wang H., Carter M.J. et al. Hemoadsorption improves long-term survival after sepsis in the rat // Critical Care Med. – 2008. – 36 (12 suppl.). – A1.
9. Ronco C., Brendolan A., Dan M. Adsorption in sepsis // Kidney International. – 2000. – 58. – S148–55.

УДК 616.333-006.6-089.87

*А.Г. Барышев***НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА****1. Клинико-иммунологические особенности кардиоэзофагеального рака***Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар***Контактная информация:***Барышев Александр Геннадиевич, доцент кафедры онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС, ГОУ ВПО***адрес:** 350004, г. Краснодар, ул. Седина 4; **тел.** +7(988)247-88-91;**e-mail:** sashapurlev@mail.ru

Статья поступила: 28.06.2010, принята к печати 16.09.2010.

Резюме

В настоящей статье представлены результаты лечения 154 больных кардиоэзофагеальным раком, которым была выполнена операция Осава-Гэрлока. При изучении естественной активности натуральных киллеров установлено, что цитотоксический индекс был выше у пациентов с умеренно дифференцированной аденокарциномой во II стадии заболевания. У больных с низко- и недифференцированными опухолями с III и IV стадиями опухолевого процесса активность натуральных киллеров была ниже, что отрицательно отразилось на отдаленных результатах лечения.

Ключевые слова: кардиоэзофагеальный рак, операция Осава-Гэрлока, натуральные киллерные клетки.

*A.G. Baryshev***CLINIKO-IMMUNOLOGIC SPECIALTIES OF THE CARDIOESOPHAGEAL CANCER****1. Clinical and immunological features kardioezofagealnogo cancer***The Kuban state medical university, Krasnodar***Abstract**

In the article we are presented the results of treatment 154 patients with cardioesophageal cancer by Osava-Garlok operation has been executed. Was studied activity of natural killers, it have been established, that the cytotoxic index above at patients with moderately differentiated adenocarcinoma in II stage of disease. At patients with low - and not differentiated tumours with III and IV stages, activity of natural killers was more low that was negatively reflected in the remote results of treatment.

Keywords: cardioesophageal cancer, operation of Osava-Garlok, natural killer cells.

Введение

За последние 20 лет, на фоне снижения заболеваемости раком желудка, отмечено заметное увеличение числа больных кардиоэзофагеальным раком (КЭР), результаты лечения которого пока трудно признать удовлетворительными [2; 7]. Рак проксимального отдела желудка и пищеводно-желудочного перехода занимает 6 место в мире среди причин смерти от онкопатологии [17]. Из всех карцином желудка опухоли этой локализации составляют от 10 до 37 % [9; 17].

В последнее время в Европе и Соединенных Штатах Америки произошли значительные изменения в структуре гистологического типа рака пищевода в сторону роста аденокарцином, что, по видимому, связано с распространением воспалительных заболеваний кардиоэзофагеальной зоны (гастроэзофагеального рефлюкса, пищевода Баррета и т.д.) [14]. Несмотря на достижения современной медицины, даже в специализированных медицинских учреждениях операбельность больных с КЭР остается низкой – 40–72 %, а резектабельность колеблется от 38 до 69 %, что не оставляет надежд на благополучный результат заболевания у значительной части пациентов с этой патологией [2; 8]. Переход опухоли на пищевод не только затрудняет хирургическое лечение, но и ухудшает непосредственные и отдаленные результаты, по сравнению с карциномами тела и дистальных отделов желудка при КЭР послеоперационная летальность составляет 4–

18 %, а 5-летняя выживаемость колеблется от 13 до 42 % [8; 9]. Такой итог КЭР во многом обусловлен не только локальной агрессивностью опухоли, выражающейся в поражении сразу двух органов и часто смежных с ними анатомических структур, но и регионарным метастазированием как в абдоминальные, так и в медиастинальные лимфатические коллекторы [18].

Кроме того, процесс прогрессии карциномы также непосредственно связан с количеством иммунокомпетентных клеток и их противоопухолевой активностью [6]. Известно, что выживаемость больных раком зависит от типа клеточной инфильтрации опухоли [10]. Высокая инфильтрация бластоми CD56⁺ клетками уменьшает риск метастазирования в регионарные лимфатические узлы.

В свою очередь, по мере прогрессирования рака и распространения по лимфатической системе, инфильтрация тканей натуральными киллерными (НК) и дендритными клетками снижается. НК-клетки – большие гранулярные лимфоциты – являются одним из компонентов врожденного клеточного иммунитета, участвуют в противоопухолевой и противомикробной защите, проявляя цитотоксическую активность, а также они задействованы в иммунорегуляции, выполняя цитокин-продуцирующие функции [1; 4; 6; 12]. Кроме того, они подавляют опухолевую прогрессию, производя ФНО и КСФ [1; 11]. Опухоль, защищаясь, подавляет активность НК через продукцию простагландина E2 и трансформирующего ростового фактора β [19].

Неудовлетворенность ближайшими и отдаленными результатами, технические трудности, возникающие при выполнении хирургического этапа лечения, тяжесть состояния больных на фоне основного и сопутствующих заболеваний, а также клинко-иммунологическая агрессивность опухоли заставляют искать новые пути эффективного лечения КЭР.

Целью данного исследования было изучение взаимосвязей клинко-иммунологических особенностей опухоли с результатами лечения больных КЭР.

Материалы и методы

С 2001 по 2007 гг. в гастроэнтерологическом отделении Клинического онкологического диспансера Краснодарского края по поводу КЭР прошли лечение 218 пациентов, среди которых преобладали лица с III и IV стадиями заболевания (табл. 1). У 64 (29,4%) больных лечение было симптоматическим; лапароторакофренотомия гастрэктомия с резекцией нижней трети пищевода и спленэктомией (операция Осава-Гэрлока) была выполнена 154 больным (70,6 %), мужчин было 123 (79,9 %), женщин – 31 (20,1 %), сопутствующие заболевания имели 117 (76 %) пациентов.

Из представленных данных видно, что в группе прооперированных больных преобладали лица с III и IV стадиями заболевания – 113 (73,4 %) пациентов (табл. 2), а по гистологической структуре – умеренно- и низкодифференцированные аденокарциномы – 127 (82,5 %) (табл. 3).

Операция Осава-Гэрлока проводилась в положении больного на правом боку, начиналась с лапаротомии с обходом пупка слева от воображаемой линии, проходящей через VI межреберье к срединной линии. После ревизии органов брюшной полости и установления резектабельности опухоли выполнялась торакотомия с пересечением левой прямой мышцы живота, реберной дуги и диафрагмотомия с удалением пищевода и окна диафрагмы. После мобилизации блока органов с лимфодиссекцией в объеме D2, удалении наддиафрагмальных и парааортальных лимфоузлов до левой нижней легочной вены, выполнялась гастрэктомия, резекция пищевода до межбронхиального сегмента, спленэктомия. Интраоперационная кровопотеря в среднем составила 450 мл. Комбинированные вмешательства выполнены 39 (25,3 %) пациентам, чаще всего – с инвазией опухоли в хвост поджелудочной железы – 19 (48,7 %) и диафрагму – 15 (38,5 %).

С целью изучения клинко-иммунологических особенностей опухоли и их влияния на результаты лечения, у 54 пациентов, которым была выполнена операция Осава-Гэрлока, с разными стадиями и гистологическими формами заболевания отобранных рандомизированно (двойным слепым методом) выделяли мононуклеары периферической крови на градиенте плотности по стандартной методике [3] и определяли цитотоксическую активность НК в отношении эритромиелоидной клеточной линии K-562 с помощью ³H-уридинового цитотоксического теста (Hashimoto, Sudo, 1971) в модификации Т.М. Рыковой с сотрудниками (1981) [5]. Уровень естественной цитотоксической активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в % [13].

Результаты и обсуждение

Из 154 больных, которым были сделаны операции Осава-Гэрлока, клинически и гистологически радикально прооперированными (R₀) были признаны

115 (74,6 %). Дисфагические проявления исходно зафиксированы у 142 (92,2 %) пациентов, дефицит массы тела у – 58 (37,6%), сопутствующая патология.

Ранние послеоперационные осложнения у 19 (12,3%) пациентов:

6 ограниченных гидротораксов,

2 эмпиемы плевры слева,

1 НШМКА

1 ТЭЛА,

3 нагноения послеоперационной раны,

6 левосторонних пневмоний, одна из которых закончилась летальным исходом. Оперативное вмешательство такого объема относится к разряду сложных, их выполняют только опытные специалисты. Большинство пациентов прооперированы в 2005-2007 гг. проводимого исследования, когда уже появился достаточный опыт выполнения операций и ведения больных в послеоперационном периоде.

Мы отказались от сохранения дистального отдела желудка и его последующего анастомозирования с пищеводом ввиду того, что эндофитное поражение проксимального отдела желудка исключает такую возможность по онкологическим показаниям, в связи распространением процесса по стенке органа.

Кроме этого, при изучении лимфатических узлов в зоне правой желудочно-сальниковой артерии мы обнаружили в них метастазы опухоли в 12 % случаев. У большинства больных 120 (77,9 %) мы встретились с КЭР, распространяющимся на желудок (Siewert – III тип), хотя данная классификация, на наш взгляд, и не является определяющей при решении вопроса об объеме операции и хирургическом доступе.

Как минимум, субтотальная резекция пищевода и правосторонняя торакотомия для полноценной лимфодиссекции необходимы при плоскоклеточном раке, поскольку при данном гистологическом типе опухоли идет ее активное лимфогенное распространение, а также возможно наличие «прыгающих» метастазов.

При выполнении операций по поводу аденокарциномы кардии мы, пересекая пищевод, отступали вверх на 5–7 см от видимого края опухоли и отпавляли стенку органа по линии отсечения для интраоперационного цитологического и затем отдельного гистологического исследования.

Наличие метастатических очагов по линии отсечения пищевода интраоперационно было установлено у 3 (1,9 %) больных, что потребовало дополнительной его резекции.

Левосторонняя лапароторакофренотомия применялась нами принципиально только у пациентов с распространением опухоли до нижней трети ретрокардиального сегмента пищевода, так как его поражение выше не всегда позволяет адекватно отступить от края новообразования для соблюдения принципа абластики, чтобы в последующем сформировать надежный пищеводно-тонкокишечный анастомоз.

Распространение опухоли на ретрокардиальный сегмент пищевода и выше зачастую сочеталось с генерализацией опухолевого процесса, технически выполнение хирургического этапа было возможно, но это не всегда оправдывалось с онкологических позиций. Нам встретилось только 3 случая, когда было возможно удалить желудок и пищевод из лапаротомного доступа транسخиатально, в данное исследование они не включались.

Метастатическое поражение лимфатических узлов выше диафрагмы наблюдалось у 25 (16,2 %) больных, никто из этой группы пациентов не прожил больше 3 лет после операции.

В процессе изучения цитотоксической активности НК на клетки K562 было обнаружено, что во II стадии и при умеренной дифференцировке опухоли эффективность клеточного иммунного ответа была выше; чем агрессивнее была карцинома и ниже степень ее дифференцировки, тем слабее проявлялась работоспособность естественных киллеров. Среди обследованных в I–II стадии заболевания было 17 человек, преобладали опухоли G₂ – 11 (64,7 %), у больных в III и IV стадиях (37) чаще встречались опухоли G₃ – 27 (72,9 %) – табл. 4.

Основой узнавания НК клеток-мишеней является комплиментарное соответствие «рецепторов естественной токсичности» на поверхности НК лигандам различного типа, модификация которых возможна в связи с действием различных стрессовых факторов, одним из которых может быть опухолевая прогрессия [15; 16].

Выводы

Таким образом установлено, что распространенность опухоли и отдаленные результаты лечения напрямую связаны с цитотоксической активностью НК, которая выше в группе больных с умеренно дифференцированной аденокарциномой при I–II ст – 29,6±7,2%, III–IV ст – 22,8±6,7%, при низкой дифференцировке рака соответственно: 18,6±6,2 %; 14,8±8,3 %. Низкодифференцированные аденокарциномы преобладают у больных КЭР, что во многом объясняет агрессивное течение болезни; снижение активности НК у пациентов этой группы отрицательно отражается на отдаленных результатах лечения. Улучшение отдаленных результатов лечения КЭР напрямую зависит от своевременной диагностики, радикализма хирургического этапа и разработки новых способов комплексного воздействия на опухоль.

Таблица 1

Распределение всех пролеченных больных КЭР по стадиям

Стадия	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Итого	%
I	1	2	0	0	0	1	0	4	1,8
II	2	5	1	0	3	11	11	33	15,1
III	10	7	10	13	12	15	11	78	35,8
IV	12	16	10	18	14	11	22	103	47,3
Всего	25	30	21	31	29	38	44	218	100

Таблица 2

Распределение больных, которым сделана операция типа Осава-Гэрлока, по стадиям

Стадия	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Итого	%
I	1	2	0	0	0	1	0	4	02,5
II	2	5	1	0	3	11	11	33	21,4
III	10	7	10	13	12	15	11	78	50,6
IV	4	5	4	7	6	7	6	39	25,3
Всего	17	19	15	20	21	34	28	154	100

Таблица 3

Гистологические типы опухоли у прооперированных больных

G	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	ИТОГО	%
G ₁	1	1	1	1	1	0	1	6	3,9
G ₂	8	6	7	8	6	10	8	53	34,4
G ₃	6	9	5	9	11	19	15	74	48,1
G ₄	2	3	2	2	3	5	4	21	13,6
Всего	17	19	15	20	21	34	28	154	100

Таблица 4

Цитотоксическая активность НК в зависимости от стадии и дифференцировки опухоли

Характеристика больных	Умереннодифференцированная аденокарцинома	Низко- и недифференцированная аденокарцинома
I–II стадия	29,6±7,2%	18,6±6,2%
III–IV стадия	22,8±6,7%	14,8±8,3%

Таблица 5

Отдаленные результаты лечения больных после операции типа Осава-Гэрлока

Стадия	3-летняя ОВ	5-летняя ОВ
I	3 (75,0 %)	2 (66,6 %)
II	17 (77,2 %)	7 (63,6 %)
III	46 (68,7 %)	15 (28,8 %)
IV	14 (42,4 %)	3 (12,0 %)
Всего	80 (100 %)	27(100 %)

Литература

1. Билинский Б.Т., Володько Н.Т., Шпарык Я.В. Иммунологические механизмы естественной противоопухолевой резистентности. – Киев: Наукова думка, 1991. – 248 с.
2. Давыдов М.И., Тер-Ованесов М.Д., Стилиди И.С. и др. Рак проксимального отдела желудка: стандарты хирургического лечения, основанные на 30-летнем опыте // Вестник Российской Акад. Мед. Наук. – 2002. – № 1. – С. 25–9.
3. Кожеевников В.С. Индукция дифференцировки Т-лимфоцитов человека тимическим фактором АФТ-6 (тактивин) // Иммунология. – 1985. – № 4. – С. 34–7.
4. Лыков А.П., Ложкин И.Д., Басс А.А. и др. Цитотоксическая активность клеток крови у больных раком желудка с различной активностью нервной системы // Иммунология. – 2000. – № 6. – С. 43–6.
5. Рыкова М.Т. Новая высокочувствительная техника тестирования нормальных киллеров // Иммунология. – 1983. – № 3. – С. 88–90.
6. Цой И.Г., Сапаров А.С., Булгенова М.Г. и др. Функциональная активность цитотоксических субпопуляций лимфоцитов локального и системного иммунитета при раке и язвенной болезни желудка // Иммунология. – 1994. – № 4. – С. 43–5.
7. Brenner H., Rothenbacher D., Arndt V. Epidemiology of stomach cancer // Methods Mol. Biol. – 2009. – 468. – P. 467–77.
8. Finley R.J., Incellet R.I. The results of esophagogastrectomy without thoracotomy for adenocarcinoma of the esophagogastric junction // Ann.Surg. – 1989. – 210(4). – P. 535–43.
9. Hansson L.E., Ekstrom A.M., Bergstrom R., Nyren O. Carcinoma of the gastric cardia: surgical practices and short-term operative results in a defined Swedish population // World. J. Surg. – 2000. – 24. – P. 473–8.
10. Ishigami S., Natsugoe S., Tokuda K. et al. Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer // Cancer let. – 2000. – 159. – P. 103–8.
11. Kitamura H., Kodama F., Odagiri S. et al. Granulocytosis associated with malignant neoplasms: a clinicopathologic study and demonstration of colony-stimulating activity of tumor extracts // Hum. Pathol. – 1989. – 20. – P. 878–85.
12. Koo G., Manyak C.L. Suppressive effects of monocytic cells and transforming growth factor-beta on natural killer cell differentiation in autoimmune viable motheating mutant mice // J. Immunol. – 1991. – 147. – P. 1194–200.
13. Leung K.H. Inhibition of human NK cell and LAK cell cytotoxicity and differentiation by PGE2 // Cell. Immunol. – 1989. – 123. – P. 384–95.
14. Lochhead P., El-Omar E.M. Gastric cancer // Brit.Med.Bull. – 2008. – 85. – P. 87–100.
15. Long E.O., Rajagopalan S. Stress signals activate natural killer cells // J. Exp. Med. – 2002. – 196. – P. 1399–402.
16. Moretta L., Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors // EMBO J. – 2004. – 23. – P. 255–9.
17. Parkin D., Pisani P., Ferlay J. et al. Global cancer statistic // Ca. Cancer J. Clin. – 1999. – 49. – P. 33–64.
18. Siewert J.R., Stein H.J. Classification of adenocarcinoma of the esophagogastric junction. // Br. J. Surg. – 1998. – 85. – P. 1457–9.
19. Taniguchi S., Dai C.H., Krautz S.B. Specific binding of interferon-gamma to high affinity receptors on human erythroid colon-forming cells // Exp. Hematol. – 1997. – 25. – P. 193–8.

УДК 616.33-006.6-033.2:616-08-036

2. Лечение метастатического рака желудка

Резюме

Экспрессия в опухоли факторов клеточной пролиферации и ангиогенеза является негативным прогностическим фактором при метастатическом раке желудка. Применение таргетной терапии позволяет улучшить результаты лечения этой группы больных.

Ключевые слова: метастатический рак желудка, химиотерапия, биотерапия, прогностические факторы.

2. The treatment metastatic gastric cancer

Abstract

Expression of cellular proliferation and angiogenesis are negative prognosis factors of metastatic gastric cancer. Application target therapies at metastatic gastric cancer to improve results of treatment.

Key words: gastric cancer, chemotherapy, biotherapy, factors of prognosis.

Введение

У пациентов с метастатическим раком желудка экспрессия факторов дифференцировки опухоли (HER-2/neu), ангиогенеза (VEGF), и других, прямо коррелирует с более агрессивным течением заболевания. Высокая пролиферативная активность опухоли

(Ki-67), отрицательно влияет на результат лечения, уменьшая длительность безрецидивной и общей выживаемости [3]. Существующие режимы химиотерапии малоэффективны [2; 6]. Применение совместно с химиотерапией таргетных препаратов, таких как герцептин, авастин, панитумумаб и др., дает значительные положительные результаты [1; 4; 5; 7].

Дальнейшее изучение биологических особенностей и факторов прогноза позволит избирательно применять различные варианты лекарственного воздействия на опухоль, что будет способствовать улучшению результатов терапии больных метастатическим раком желудка. Цель исследования – повышение эффективности лечения метастатического рака желудка. **Задачи** исследования – изучить особенности течения метастатического рака желудка ($T_{1-4}N_{1-3}M_1$) во взаимосвязи с биологическими особенностями, гистологической структурой, формой роста, локализацией и пролиферативной активностью опухоли. Изучить ближайшие и отдаленные результаты лечения больных метастатическим раком желудка.

Материалы и методы

В работе были использованы данные 17 пациентов, страдавших метастатическим раком желудка ($T_{1-4}N_{1-3}M_1$), получавших лечение в 2006–2009 гг. Группа состояла из 5 (29,4 %) женщин и 12 (70,6 %) мужчин. Средний возраст 54 года. Наибольшее число пациентов в этой группе были в возрасте 21–47 лет (41,1 %). Всем 17 (100 %) пациентам была проведена химиотерапия по схеме DCF (доцетаксел 75 мг/м² 1 день, цисплатин 75 мг/м² 1 день, 5-фторурацил 750 мг/м² 1–5 дни, суточная инфузия). Трое пациентов параллельно с химиотерапией получали авастин 7,5 мг/кг 1 раз в 3 недели, с последующим продолжением после окончания химиотерапии до прогрессирования опухолевого процесса. Наряду с традиционными видами диагностики, выявляющими распространенность опухолевого процесса, также изучали гистологический тип и дифференцировку опухоли, а также ее биомолекулярные маркеры.

Хирургическое лечение, в объеме расширенной гастрэктомии (D2), получили четверо пациентов на первом этапе (до химиотерапии) и трое пациентов после химиотерапии по данной схеме (после полного исчезновения клинических признаков метастазирования).

Клинико-морфологические особенности метастатического рака желудка

Размеры опухоли в исследуемой группе были разнообразны: T_1 – 3 (17,6 %) пациента, T_2 – 3 (17,6 %), T_3 – 4 (23,5 %), T_4 – 7 (41,1 %) пациентов. Опухоль локализовалась: малая кривизна – 5 (29,4 %) пациентов, большая кривизна – 3 (17,6 %) пациента, субкардиальный отдел – 2 (11,7 %), инфильтративная форма – у 7 (41,1 %) пациентов. Все пациенты имели распространенный метастатический процесс с поражением: брюшины – 12 (70,6 %), печени – 10 (58,8 %), легких – 2 (11,7 %), забрюшинных и параортальных лимфоузлов – 7 (41,1 %) и лимфоузлов грудного лимфатического протока – 1 (5,8 %). Морфологическая характеристика опухоли: аденокарцинома – 14 (82,3 %); перстневидно-клеточный рак выявлен в 1 (5,8 %) случае; недифференцированный – в 2 (11,6 %) случаях. Степень дифференцировки опухоли G_3 была у 9 (52,9 %) больных.

Положительные рецепторы EGFR выявлены у 16 (94,1 %) больных (табл. 1). Отрицательные HER2/neu рецепторы в опухоли в группе выявлены только у 3 (17,6 %) пациентов, положительные HER2/neu (+; ++; +++) рецепторы – у 14 (82,3 %). Экспрессия VEGF определялась у всех 17 (100 %) пациентов (табл. 1). Максимальный уровень экспрессии маркера клеточной пролиферации (Ki-67) оказался у пациентов с опухолью T_4 (табл. 2).

Таблица 1

Экспрессия рецепторов EGFR, Her2/neu, VEGF у пациентов с метастатическим раком желудка

Рецепторы/пациенты	$T_1N_{1-3}M_1$	$T_2N_{1-3}M_1$	$T_3N_{1-3}M_1$	$T_4N_{1-3}M_1$
EGFR:				
–	–	–	–	1 (5,8 %)
+	–	1 (5,8 %)	–	1 (5,8 %)
++	1 (5,8 %)	1 (5,8 %)	2 (11,6 %)	1 (5,8 %)
+++	2 (11,6 %)	1 (5,8 %)	2 (11,6 %)	4 (23,6 %)
HER2/neu:				
–	1 (5,8 %)	1 (5,8 %)	–	1 (5,8 %)
+	2 (11,6 %)	–	–	2 (11,6 %)
++	–	1 (5,8 %)	3 (17,6 %)	3 (17,6 %)
+++	–	1 (5,8 %)	1 (5,8 %)	1 (5,8 %)
VEGF:				
–	–	–	–	–
+	–	–	1 (5,8 %)	–
++	1 (5,8 %)	1 (5,8 %)	1 (5,8 %)	2 (11,6 %)
+++	2 (11,6 %)	2 (11,6 %)	2 (11,6 %)	5 (29,4 %)

Таблица 2

Уровень пролиферации Ki-67 у пациентов, страдавших метастатическим раком желудка

Уровень Ki-67 /пациенты	$T_1N_{1-3}M_1$ n=3	$T_2N_{1-3}M_1$ n=3	$T_3N_{1-3}M_1$ n=4	$T_4N_{1-3}M_1$ n=7
0–25 %	–	–	–	1 (5,8 %)
26–50 %	–	–	1 (5,8 %)	1 (5,8 %)
51–75 %	2 (11,6 %)	1 (5,8 %)	1 (5,8 %)	2 (11,6 %)
76–100 %	1 (5,8 %)	2 (11,6 %)	2 (11,6 %)	3 (17,6 %)

Результаты терапии

Полный эффект (в том числе полный морфологический эффект) наблюдался у 1 (5,8 %) пациента. Частичная регрессия наблюдалась у 4 (23,4 %) пациентов, стабилизация процесса отмечена у 9 (52,9 %) пациентов, у 2 (11,6 %) – прогрессирующее опухолевое процесса.

Безрецидивная выживаемость наблюдалась у 15 (88,2 %) пациентов, у которых наблюдался положительный клинический эффект и составила 6,7 мес. У 12 (70,5 %) пациентов с положительными рецепторами EGFR, безрецидивная выживаемость была 5 мес.

Безрецидивная выживаемость пациентов с положительными HER2/neu (1+, 2+, 3+) рецепторами у 11 (64,7 %) пациентов составила 5,7 мес. У пациентов, получавших авастин, безрецидивная выживаемость была 8,6 мес.

В первый год лечения умерло 9 (52,9 %) пациентов, во второй – 5 (29,4 %) пациентов. Больше 2 лет прожили 3 (17,6 %) пациента, которые живы до настоящего времени.

Медиана выживаемости составила 14 мес. У 16 (94,1 %) пациентов с положительными рецепторами EGFR безрецидивная выживаемость составила 10,6 месяцев.

Выживаемость пациентов с положительными HER2/neu (+; ++; +++) рецепторами у 14 (82,3 %) пациентов была 12,3 мес. У пациентов, получавших авастин, выживаемость составила 20,3 мес.

Литература

1. *Jhawer M.P., Ilson D., Robinson E.* Interim results of a phase II study of modified docetaxel, cisplatin, and fluorouracil (m DCF), and bevacizumab (BEV) in patients with metastatic gastroesophageal (GE) adenocarcinoma // ASCO. – 2008. – Gastrointestinal Cancer Symposium. – abstr. 109.
2. *Kazmi S.M., Jhamb J.* Toxicity and efficacy of a weekly-based docetaxel, cisplatin, and 5FU (DSF) as first-line treatment for advanced gastric and esophageal cancer // ASCO. – 2009. – Gastrointestinal Cancer Symposium. – abstr. 68.
3. *Liotta L., Stetler-Stevenson W.* Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metastasis. – Cancer principles and practice of oncology. – Ed. By V. De Vita, J. Lippincott company, 1989. – P. 98–115.
4. *Okines A.F., Ashley S.* Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine +/- panitumumab for advanced oesophagogastric (OG) cancer: Dose-finding study for prospective multicenter randomized phase II/III REAL3 trial // Gastrointestinal Cancer Symposium. – 2010. – abstr. 73.
5. *Stoecklein M., Schemanski O.* Intraoperative immunotherapy with the trifunctional antibody catumaxomab in patients with advanced gastric, colon, and pancreatic cancer: A pilot phase I study // ASCO. – 2008. – Gastrointestinal Cancer Symposium. – abstr. 120.
6. *Sym S., Ryu M., Lee J. et al.* Phase I study of docetaxel, capecitabine, and oxaliplatin (DXO) combination chemotherapy as a first-line treatment in patients with advanced gastric cancer // ASCO. – 2008. – Gastrointestinal Cancer Symposium. – abstr. 122.
7. *Van Cutsem E., Kang Y.* Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER 2)-positive advanced gastric cancer (GC) // J Clin Oncol. – 2009. – 27. – 18s (suppl; abstr LBA4509).

Выводы

Высокая агрессивность опухоли, плохие результаты выживаемости пациентов с метастатическим раком желудка, недостаточная эффективность химиотерапии требуют поиска современных способов ранней диагностики и наиболее эффективных методов лечения данной патологии.

У большинства пациентов с метастатическим раком желудка опухоль выходила за пределы органа, а также преобладала эндофитная форма роста – 7 (41,1 %). Морфологически метастатический рак был представлен с аденокарциномой в 82,3 %, причем низкодифференцированный вариант выявлен у 52,9 % больных.

Агрессивный характер течения опухолевого процесса у большинства пациентов был сопряжен с гиперэкспрессией рецепторов: EGFR – 94,1 %, HER2/neu (+; ++; +++) – 82,3 %, а VEGF – у всех 100 %. Максимальный уровень экспрессии маркера клеточной пролиферации (Ki-67) выявлен у пациентов с инвазивной опухолью T₄. Применение схемы DCF самостоятельно, а также в комбинации с авистином, улучшает результаты лечения, увеличивает выживаемость больных метастатическим раком желудка.

В будущем поиск новых предикторов прогнозирования метастазирования и применение современных препаратов таргетной терапии, направленных на подавление клеточной пролиферации, ангиогенеза и других механизмов прогрессирования опухолевого процесса, позволят улучшить результаты лечения пациентов с распространенным раком желудка.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
 АЛС – антилимфоцитарная сыворотка
 АТГ – антитимоцитарный глобулин
 БКС – бинарная каталитическая система
 ВКМ – внеклеточный матрикс
 ВРПС – водорастворимые полисахариды
 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
 ИДМ – иммунодефицитные мыши
 ИФН- γ – интерферон гамма
 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
 КРР – колоректальный рак
 КЭР – кардиозофагеальный рак

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
 ТСХ – тонкослойная хроматография
 ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка
 УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография
 ФГА – фитогемагглютинин
 ФД – флуоресцентная диагностика
 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-Ingaron
 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

Содержание Российского Биотерапевтического Журнала за 2010

№ 1-2010

АБИСИЛИН®

<i>Лацерус Л.А., Барышников А.Ю.</i> РАСТИТЕЛЬНЫЕ ТЕРПЕНОИДЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ	3
<i>Лацерус Л.А., Пинигина Н.М., Барышников А.Ю., Огородникова М.В.</i> ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК	9
<i>Лацерус Л.А., Пинигина Н.М., Барышников А.Ю., Степанова Е.В.</i> АНТИАНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® IN VITRO И IN VIVO	13
<i>Лацерус Л.А., Пинигина Н.М., Смирнова З.С., Барышников А.Ю.</i> ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН®	17
<i>Лацерус Л.А., Пинигина Н.М., Смирнова З.С., Барышников А.Ю.</i> ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® В КОМБИНАЦИИ С ЦИСПЛАТИНОМ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ	21
<i>Лацерус Л.А., Пинигина Н.М., Козлов А.М., Барышников А.Ю.</i> ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® НА ПРОЦЕСС СПОНТАННОГО РЕЦИДИВИРОВАНИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС МЫШЕЙ	25
<i>Лацерус Л.А., Пинигина Н.М., Козлов А.М., Барышников А.Ю.</i> ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® НА ПРОЦЕСС ИСКУССТВЕННОГО РЕЦИДИВИРОВАНИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС МЫШЕЙ	29
<i>Лацерус Л.А., Березовская И.В., Рымарцев В.И., Пинигина Н.М.</i> ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ	35
<i>Лацерус Л.А.</i> ПРИМЕНЕНИЕ ТЕРПЕНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ	39

БИОТЕРАПИЯ

<i>Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С., Морозова Л.Ф., Михайлова И.Н., Барышников А.Ю.</i> СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ HSP70 НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ	43
<i>Соколова Д.В., Степанова Е.В., Голубева В.А., Трещалина Е.М., Барышников А.Ю.</i> ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КСЕНОГРАФТОВ ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА ЛБР-2 КАК МИШЕНИ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ	49
<i>Соколова Т.М., Соколова З.А., Рубцова М.А., Барышников А.Ю.</i> ЭКСПРЕССИЯ ИНТЕРФЕРОНЗАВИСИМЫХ И АПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ DU145: ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ИНТЕРФЕРОНОВ И ИХ ИНДУКТОРОВ – ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК	53
<i>Ермакова Н.П., Михайлова И.Н., Меркулова И.Б., Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Абрамова Т.В., Барышников К.А., [Михайлова Л.М.]</i> ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ «МЕЛАВАК»	57
<i>Михайлова И.Н., Иванов П.В., Петенко Н.Н., Барышников К.А., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Черемушкин Е.А., Субраманиан С., Чкадуа К.З., Барышников А.Ю., Демидов Л.В.</i> ВНУТРИКОЖНАЯ КЛЕТОЧНАЯ РЕАКЦИЯ НА ФОНЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ	63

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Кудинова Н.В., Березов Т.Т.</i> ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ: ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ЛЕЧЕНИЯ	69
---	----

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ

<i>Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В.</i> РОЛЬ КАРОТИНОИДОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	77
---	----

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

<i>Чекалова М.А., Мнацаканян Л.К., Кузнецов В.В., Захарова Т.И., Дворова Е.К., Камаева О.В., Кузумова А.А.</i> ВОЗМОЖНОСТИ ЭХОГРАФИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАЗОВ ЛЕЙОМИОСАРКОМЫ ТЕЛА МАТКИ	87
<i>Шаназаров Н.А., Сабиров А.Х., Синяков А.Г., Симонов А.В., Райков Н.С., Сидоров Е.В., Велижанина О.С.</i> ЗНАЧИМОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА	91
<i>Т.Т. Березов, Л.К. Овчинникова, О.М. Кузнецова, З.К. Карабекова, И.К. Воронников, М.В. Гришкевич, А.А. Тулеуова, И.В. Терешкина, У.Р. Мамедов, Е.К. Дворова</i> VEGF В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	100
К 90-летию со дня рождения С.П. Ярмоненко	102
Список сокращений	102
Правила оформления статей	12; 24; 34; 42; 48; 68

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Т.В. Ахлынина, Н.И. Гринева, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Д.А. Шмаров, Т.Г. Сарычева, А.М. Тимофеев, Н.М. Найденова, Т.В. Боровкова, Г.П. Саркисян, А.Р. Гавричкова, Л.Ю. Колосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, А.В. Воронцова, А.Г. Туркина</i> РАЗЛИЧИЯ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ Rh⁺ КЛЕТОК ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ХМЛ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ. Rh⁺ КЛЕТКИ С НИЗКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ПРОЛИФЕРАЦИИ И СПОСОБНОСТЬЮ БЛОКИРОВАТЬ АПОПТОЗ.	3
<i>И.М. Михайлова, И.Б. Меркулова, Н.П. Ермакова, А.И. Мишин, Н.Ю. Кульбачевская, В.М. Бухман</i> МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ТУМОРОГЕННОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И БИОПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ ПРИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ.	13
<i>Е.А. Сафонова, К.А. Лопатина, Т.Г. Разина, Е.П. Федорова, А.В. Пахомова, А.В. Вычужанина, Е.П. Зуева, Л.А. Ефимова</i> КОРРЕКЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПАКЛИТАКСЕЛА НА СИСТЕМУ КРОВИ И ЭПИТЕЛИЙ ТОНКОЙ КИШКИ ВОДОРАСТВОРИМЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ МАТЬ-И-МАЧЕХИ ОБЫКНОВЕННОЙ, АИРА БОЛОТНОГО И ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ.	19
<i>Б.А. Бакиров, А.В. Варшавский, А.Б. Бакиров</i> ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ НА ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН.	25
<i>Н.В. Андронова, Н.Т. Райхлин, Е.М. Трещалина, Н.В. Шалунова, А.Ю. Барышников</i> РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ОНКОГЕННЫХ ПОТЕНЦИЙ МЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ.	29
<i>Н.А.В. Киселев, Г.А. Гордина, И.Ю. Кубасова, С.А. Зорина, О.И. Тарасова</i> РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОФОРМЛЕНИЮ ЗАЯВОК НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ.	35

ТЕЗИСЫ

Клиническая онкология.....	39
Экспериментальная онкология.....	49
Экспериментальная химиотерапия.....	63
Лекарственные формы.....	87
ФДТ.....	93

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Чан Тхи Хай Иен¹, В.И. Поздеев², Г.А. Меерович³, С.Ш. Кариева², Л.М. Борисова², О.Л. Орлова², А.П. Полозкова², Г.В. Раменская¹, Н.А. Оборотова²</i> ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ФОТОДИТАЗИНА.	105
Список сокращений.....	104
Правила оформления статей.....	24; 108-9

ТЕЗИСЫ

Материалы II Всероссийской научной конференции с международным участием «Наноонкология»,
Тюмень, 26–28 сентября 2010 г.3

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

В.Л. Карапетян, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, С.О. Никогосян, В.В. Кузнецов
**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА KI-67
В ТКАНИ ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ I–II СТАДИЙ**.....31

*А.Е. Бармашов, К.Д. Никитин, И.Н. Михайлова, Л.Ф. Морозова, А.Н. Иншаков,
К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников*
**ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА
МЕТОДОМ ELISPOT У БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ВАКЦИНУ «МЕЛАВАК»**.....37

*Н.В. Голубцова¹, И.Н. Михайлова¹, В.В. Новиков², К.А. Барышников¹, Н.Б. Преснякова²,
Е.В. Огородникова¹, Н.Н. Петенко¹, К.А. Парсункова³, О.С. Бурова¹, Г.З. Чкадуа¹,
Л.В. Демидов¹, А.Ю. Барышников¹*
**ИЗМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ
РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ HLA I КЛАССА,
АНТИГЕНА CD8 И РАСТВОРИМОГО КОМПЛЕКСА HLA-I-CD8
У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ
В ПРОЦЕССЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ**.....41

И.В. Манина, Н.М. Перетолчина, Н.С. Сапрыкина, А.М. Козлов, И.Н. Михайлова, А.Ю. Барышников
**ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ
С ПОМОЩЬЮ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН,
СЕКРЕТИРУЮЩИХ GM-CSF**.....47

*О.В. Хугаева¹, Н.П. Яворская¹, И.С. Голубева¹, М.А. Кортава¹, Д.В. Соколова¹, Е.В. Тазина¹,
Е.В. Игнатъева¹, А.П. Полозкова¹, Н.А. Оборотова¹, А.Ю. Барышников¹, И.И. Краснюк²*
**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ
РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МИТОКСАНТРОНА**.....51

Д.В. Соколова, Е.М. Трещалина, Н.В. Андропова, Е.В. Степанова, В.А. Голубева, А.Ю. Барышников
**МОДЕЛИ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ IN VIVO
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ
ПРОТИВ АНТИГЕНА MUC1**.....55

М.Н. Якунина, Я.В. Вишневская, Е.М. Трещалина
**ТАКСОТЕР И ДОКСОРУБИЦИН В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ДИФфуЗНОГО
И ИНФИЛЬТРАТИВНО-ОТЕЧНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СОБАК.
ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**.....61

М.А. Чекалова, В.В. Кузнецов, М.Н. Колпакова
**ВОЗМОЖНОСТИ ТРЕХМЕРНОЙ ЭХОГРАФИИ
В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ТЕЛА МАТКИ**.....65

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Л.В. Плетнева, А.Ф. Лазарев
ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ.....69

*В.А. Хайленко^{1,2}, В.А. Агафонов¹, Т.Х. Мень², Е.Ф. Ткачева¹, А.В. Дударев³,
А.М. Сдвижков⁴, П.Г. Богуш⁵, Э.И. Мордухович⁶*
**ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ И СИФИЛИС:
ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И СОВРЕМЕННОСТЬ**.....77

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

И.С. Давиденко
НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....87

ТЕЗИСЫ

Материалы IX Всероссийской научной конференции
«ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ»,
Нижний Новгород, 18–19 мая 2010 г.99

Правила оформления статей.....29-30; 36

Натан Танфелевич Райхлин. К 85-летию со дня рождения.....102

Список сокращений.....104

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р.</i> ИНГИБИТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ.....	3
<i>Короленкова Л.И., Степанова Е.В., Барышников А.Ю.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА, КАК ФАКТОРЫ ПРОГРЕССИИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ.....	11
<i>Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бибилашвили Р.Ш.</i> РАКОВО-ТЕСТИКУЛАРНЫЕ АНТИГЕНЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ВАКЦИНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ.....	17
<i>Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Личиницер М.Р.</i> ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ NFκB В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.....	27
<i>Зинченко С.В., Рудык А.Н., Хасанов Р.Ш.</i> ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАЗАМИ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА И АДЕНОКАРЦИНОМЫ БЕЗ ВЫЯВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА.....	31
<i>Якушева Т.А., Когония Л.М., Федотов А.Ю., Гришина И.М., Северцев А.Н., Байрамов Э.Т.</i> АВАСТИН В ЛЕЧЕНИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА.....	35
<i>В.И. Масычева, А.О. Белкина, Е.Д. Даниленко, Г.М. Сысоева</i> НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПРЕПАРАТОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ.....	39

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Мудунов А.М.</i> ВЫБОР ТАКТИКИ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С САРКОМАМИ ОСНОВАНИЯ ЧЕРЕПА: ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.....	45
<i>А.Т. Амирасланов¹, Х.К. Мурадов², А.Г. Велиева¹</i> ВЛИЯНИЕ ЭНДОКРИННО-КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА НА ТЕЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ ГОРМОНПРОДУЦИРУЮЩЕГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	51
<i>И.Н. Михайлова, К.Д. Никитин, Н.Н. Петенко, К.А. Парсункова, И.А. Утяшев, М.А. Рубцова, Г.З. Чкадуа, К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников</i> МЕТОД ELISPOT ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, НАГРУЖЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫМ ЛИЗАТОМ.....	55
<i>Н.И. Гринева, Т.В. Ахлынина, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Т.Г. Сарычева, Д.А. Шмаров, А.М. Тимофеев, Н.М. Найденова, Г.П. Саркисян, Т.В. Боровкова, А.Р. Гавричкова, Л.Ю. Колосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, С.В. Кузнецов, О.Ю. Виноградова, Е.Ю. Чельшева, А.Г. Туркина</i> РАЗЛИЧИЯ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ P^h КЛЕТОК ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ХМЛ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ: 3. P^h КЛЕТКИ С ЧЕРЕДОВАНИЕМ ЭТАПОВ ЭФФЕКТИВНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЭФФЕКТИВНОГО СОЗРЕВАНИЯ.....	61

Г.П. Генс ¹ , Н.И. Моисеева ² , Т.П. Стромская ² , Е.Ю. Рыбалкина ² , А.В. Вайман ² , Л.П. Овчинников ³ , А.А. Ставровская ² ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКА УВ-1 И ХИМИОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	77
Е.С. Герштейн, А.М. Щербаков, А.М. Платова, Г.Ю. Чемерис, А.А. Тулеуова, З.К. Карабекова, И.В. Терешкина, Л.К. Овчинникова, М.В. Грицкевич, В.П. Летагин СОДЕРЖАНИЕ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB В ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	85
А.И. Катунина, Е.С. Герштейн, В.Д. Ермилова, И.В. Терешкина, А.Ю. Назаренко, А.А. Тулеуова, О.В. Кузнецова, З.К. Карабекова, М.В. Грицкевич, Е.К. Дворова, Т.Т. Березов СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 2; 7 И 9 В ОПУХОЛЯХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	89
А.В. Караулов ¹ , Н.Ю. Анисимова ² , Ю.И. Должикова ² , С.И. Сокурено ^{1,3} , В.Ф. Ликов ¹ , Т.В. Борисова ¹ , М.В. Киселевский ² СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ.....	93
И.Н. Григорьева, О.С. Бурова, Е.В. Степанова, Т.К. Харатишвили, А.Ю. Барышников СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ К ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ.....	97
Н.В. Голубцова ¹ , И.Н. Михайлова ¹ , В.В. Новиков ² , К.А. Парсункова ³ , И.В. Самойленко ¹ , Н.Н. Петенко ¹ , Е.В. Огородникова ¹ , В.Н. Тазаев ¹ , Е.А. Черемушкин ¹ , К.А. Барышников ¹ , Е.В. Коржевская ¹ , Н.Б. Преснякова ² , Г.З. Чкадуа ¹ , Л.В. Демидов ¹ , А.Ю. Барышников ¹ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ УРОВНЕЙ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ HLA I КЛАССА И АНТИГЕНА CD8 У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ.....	103
Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИ-HIS ДОМЕНОВ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЧИСТКИ ИНТЕРФЕРОНА-α-2b ЧЕЛОВЕКА.....	107
Н.Ю. Анисимова ¹ , В.А. Даванков ² , М.И. Будник ¹ , Т.С. Спирина ² , М.В. Киселевский ¹ НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИСТИРОЛА, СПОСОБНЫЕ ЭЛИМИНИРОВАТЬ МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ КРОВИ.....	113
Л.Н. Пылев, Л.А. Васильева, О.В. Смирнова ТОРМОЗЯЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА «ГАЛАВИТ™» НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМОЙ МЕЗОТЕЛИОМЫ ПЛЕВРЫ У КРЫС WISTAR.....	115
А.Ф. Лазарев ¹ , В.В. Климачев ² , В.Т. Зорькин ² , И.П. Бобров ² , А.М. Авдалян ¹ ОСОБЕННОСТИ МАРКЕРОВ KI-67, PCNA, P53 И АКТИВНОСТИ НЕОАНГИОГЕНЕЗА В ПРОГНОЗЕ РАКА ЖЕЛУДКА.....	117
О.И. Казанов ¹ , Н.Е. Торопова ² , С.В. Козлов ¹ КОНТРОЛЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫПОЛНЕНИЯ РАДИОЧАСТОТНОЙ АБЛАЦИИ КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ МЕТАСТАЗОВ ПЕЧЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОНКОМАРКЕРОВ.....	123
А.Г. Барышев НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА 1. Клинико-иммунологические особенности кардиоэзофагеального рака..... 2. Лечение метастатического рака желудка.....	127 130
Список сокращений.....	133
Содержание журналов за 2010 год.....	134
Правила оформления статей.....	139

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



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Издание 2-е, переработанное и дополненное

**ЭНЦИКЛОПЕДИЯ
КЛИНИЧЕСКОЙ
ОНКОЛОГИИ**

**Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ**