

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 2 Том 5 2006 г.

УДК 616-085.2/3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

А.В. Караулов, член-кор. РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва), Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф.

Редколлегия

М.А. Барышникова, Н.А. Батурина, О.А. Бочарова, д-р биол. наук (Москва),
Э.К. Возный, д-р мед. 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 (Москва),
П.К. Иванов, д-р мед. наук (Москва), З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва), В.М. Моисеенко, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург),
В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород),
Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.В. Степанова, канд. мед. наук (Москва),
Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва), С.А. Тюляндин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

Редакционный совет

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

Подписной индекс 81679

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

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

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

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

Объем 6,75 усл. печ. листов,
подписано в печать 12.07.2006
Тираж 1000 экз.

СОДЕРЖАНИЕ

Правила оформления работ для опубликования в «Российском биотерапевтическом журнале» 4

Обзоры литературы

Стволовые (клоногенные) клетки злокачественных опухолей: возвращаясь к полученным данным

В. И. Чиссов, Н. С. Сергеева, И. К. Свиридова, И. И. Пелевина 7

Иммунорегуляторные CD25⁺ CD4⁺ Т-клетки

З. Г. Кадагидзе, А. И. Черткова, Е. Г. Славина 13

Динамическая структура хроматина

Д. Ю. Блохин 21

Генетические и эмбриологические аспекты получения трансгенных животных

Н. М. Сураева 34

Вирус гепатита С как возможный этиологический фактор развития неходжкинских лимфом

К. Д. Никитин 43

Диагностика

Тест-система в формате биочипа для одновременного количественного определения общей и свободной форм простата-специфического антигена в сыворотке крови

Т. П. Рябых, Т. В. Осипова, Е. И. Дементьева, Е. Н. Савватеева, Е. В. Коновалова, З. А. Соколова, А. Ю. Рубина, А. Ю. Барышников, А. С. Заседателей 49

Морфологическая характеристика рака эндометрия II стадии

Е. А. Мустафина, М. А. Шабанов, В. В. Баринов, Л. И. Бокина, В. П. Козаченко 58

Метод оценки инвазивной активности опухолевых клеток в отборе потенциальных ингибиторов метастазирования

С. М. Киселев, А. В. Аклеев, А. М. Козлов 66

Фотодинамическая терапия

Новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона на основе производных бактериохлорина Р: предварительные результаты изучения *in vivo*

И. Г. Меерович, М. А. Грин, Г. А. Меерович, А. Г. Ципровский, О. А. Масс, А. В. Журов, С. В. Барканова, Л. М. Борисова, Н. А. Оборотова, В. Б. Лощенов, А. Ю. Барышников, А. Ф. Миронов 73

Исследование флуоресцентных свойств наночастиц фталоцианина алюминия в микроповреждениях эмали зуба

С. Ю. Васильченко, А. И. Волкова, С. Б. Коровин, В. Б. Лощенов, М. Л. Синяева, Ад. А. Мамедов, Е. А. Лукьянец, С. Г. Кузьмин 77

Клиническая биотерапия

Иммунологическая коррекция препаратом Галавит больных колоректальным раком

В. С. Ананьев, В. М. Кулушев, О. В. Короткова, Н. Ю. Залит, Е. В. Вардапетян81

Возможности повышения эффективности комплексного лечения распространенного рака желудка фитоадаптогеном

*С. В. Чулкова, О. А. Бочарова, А. А. Клименков, Р. В. Карпова, А. И. Беневский,
Э. Г. Горожанская85*

Результаты I-II фазы клинических испытаний препарата Имутеран

Л. В. Манзюк, Е. В. Артамонова, Т. А. Кармакова, Р. Я. Якубовская93

Опыт применения Канглайта для инъекций в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина РАМН

А. М. Гарин, А. Ю. Барышников, З. Г. Кадагидзе, И. С. Базин98

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РАБОТ ДЛЯ ОПУБЛИКОВАНИЯ 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 зарубежного исследования.

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 должны иметь главы:

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 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 построен данный график.

Обзорные статьи не должны превышать 17 страниц, оригинальные – 12 страниц.

Весь текст должен быть набран шрифтом Times New Roman 12 через полуторный интервал. Ширина полей: левое – 30 мм, верхнее – 20 мм, правое – 15 мм, нижнее – 20 мм. Текст должен быть выровнен по левому краю, не содержать переносов. Все страницы должны быть пронумерованы. Номер страницы должен быть расположен внизу справа, начиная со второй. Каждый абзац

должен начинаться с отступа, который устанавливается меню «Абзац». Не следует использовать для отступа клавишу Tab. При наборе не использовать буквы «Ё» или «ё», заменяя их соответственно на «Е» и «е».

Десятичные дроби следует писать через запятую.

Для выделений в тексте не нужно использовать разрядку, лучше сделать это *курсивом*. 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 следует.

В начале статьи следует указать *инициалы и фамилии авторов, Название статьи, название учреждения* (если авторы работают в разных учреждениях, уточнить это дополнительно). Авторы несут ответственность за точность предоставляемой ими информации о себе и месте своей работы.

В начале статьи должно быть приведено **Резюме** где кратко без рубрикации 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 упоминании 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 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 графиков. Размерность величин указывается через запятую. Таблица не должна содержать пустых ячеек (отсутствие дан-

ных 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. При оформлении таблицы следует использовать функцию «Все границы». Примечания к таблицам выносятся в последней строке таблицы тем же шрифтом. Каждое примечание должно располагаться с новой строки, быть 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 сканируются в масштабе 100 % с разрешением 300 dpi. Рентгенограммы, сонограммы, фотографии сканируются в режиме «Gray». Целесообразно объединять однотипные рисунки в один, обозначая их «а», «б» и т.д. Каждый рисунок должен быть прислан отдельно и соответствовать указанным выше требованиям по качеству.

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

В подписи под рисунками должны быть объяснены все кривые, буквенные, цифровые и другие условные обозначения. В подписях под микрофотографиями следует указать методику микрофотографии, 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 или 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 авторами 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. Номер ссылки указывается в квадратных скобках.

В списке литературы в алфавитном порядке перечисляются курсивом фамилии и инициалы ав-

торов 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. 143-148.), 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 предшествуют. — 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.

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

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 от-

правляется 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 не подкрепленных достоверными фактами деклараций, противоречащих современным научным представлениям и опыту.

Редакция журнала осуществляет научное и литературное редактирование статей, обязуется информировать авторов о 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.

УДК 611-018.46:616-006.6-08

V. I. Chissov¹, N. S. Sergeeva¹, I. K. Sviridova¹, I. I. Pelevina²

THE STEM (CLONOGENIC) CELLS OF CANCER: RETURNING TO THE EARLIER RECEIVED DATA

¹Moskow Herzen Research Oncological Institute, Moscow

²Institute of chemical physics RAS, Moscow

ABSTRACT

The represented in this article data on cloning some of human malignant neoplasms was received about 20 years ago by authors and a variety of scientific groups. The results of research are discussing in view of contemporary opinions on the biology of tissue stem cells and pathogenetic therapy, directed on the effective tumor stem cells sterilization.

Key words: clonogenic (stem) tumor cells, tissue stem cells, pathogenetic therapy of cancer.

В. И. Чиссов¹, Н. С. Сергеева¹, И. К. Свиридова¹, И. И. Пелевина²

СТВОЛОВЫЕ (КЛОНОГЕННЫЕ) КЛЕТКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ: ВОЗВРАЩАЯСЬ К ПОЛУЧЕННЫМ ДАННЫМ

¹ФГУ МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва

²Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва

РЕЗЮМЕ

В работе представлены данные по клонированию ряда злокачественных новообразований человека, полученные авторами и различными научными группами около 20 лет назад. Результаты исследования обсуждаются в свете современных представлений о биологии стволовых тканевых клеток и патогенетической терапии, направленной на эффективную стерилизацию стволовых клеток опухоли.

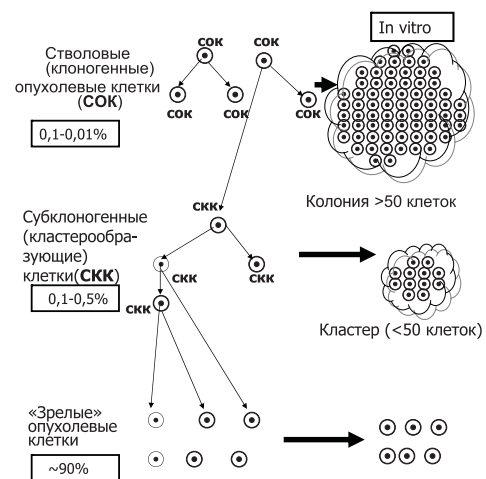
Ключевые слова: клоногенные (стволовые) клетки опухоли, стволовые тканевые клетки, патогенетическая терапия рака.

В 1971 г. А. Hamburger и S. Salmon [21] описали метод культивирования опухолевых клеток в полужидком агаре. С помощью него в карциномах человека удалось выявить по крайней мере 3 популяции опухолевых клеток, различающихся по пролиферативным потенциям и, вероятно, по своему значению для развития опухолевого процесса и исхода лечения:

1) «минорную» популяцию стволовых (клоногенных) клеток с неограниченным пролиферативным потенциалом, образующих в полужидком агаре колонии, содержащие более 50 (т. е. $>2^5$) клеток;

2) субклоногенные (коммитированные) опухолевые клетки с ограниченным пролиферативным потенциалом, образующие в полужидком агаре кластеры, содержащие < 50 (т. е. $<2^5$) клеток;

3) неделящиеся («зрелые») опухолевые клетки (см. рисунок).



Иерархическая модель организации клеток опухоли в отношении способности к пролиферации

Было высказано предположение о том, что стволовые (клоногенные) опухолевые клетки способны к асимметричному делению, при котором дочерние клетки отличаются друг от друга своей судьбой: одна остается стволовой, а другая переходит в разряд коммитированных [37]. Не исключалась также возможность деления стволовой клетки на 2, т. к. их количество в опухоли с развитием опухолевого процесса возрастает [37; 41], равно как и возрастает их гетерогенность вследствие генетической нестабильности, что показано в последние годы [15; 33].

По данным ряда авторов, эффективность колониеобразования (ЭКО) у большинства злокачественных новообразований не превосходит в среднем 0,1 % [11; 18; 29], т. е. лишь 1 из нескольких тысяч опухолевых клеток является клоногенной. Сразу следует заметить, что после ряда пассажей в полужидком агаре ЭКО опухолевых клеток увеличивается [18]. Последнее, с одной стороны, свидетельствует о том, что стволовые опухолевые клетки способны к симметричному делению, а, с другой, что при культивировании идет отбор в сторону наиболее агрессивных опухолевых популяций.

Около 20 лет назад, когда были опубликованы эти данные, не было описано ни цитологических, ни биохимических, ни иммунологических маркеров стволовых опухолевых клеток, поэтому их существование достаточно долго подвергалось сомнению. Поскольку единственной отличительной чертой этих клеток являлась неограниченная пролиферация, то наиболее информативным методом их выявления было клонирование в полужидком агаре. Кстати, необходимо заметить, что этот метод культивирования стволовых опухолевых клеток остается основным и сегодня [38]. В настоящее время при лавинообразном количестве работ, посвященных стволовым тканевым клеткам, высказываются предположения о происхождении стволовых опухолевых клеток от нормальных стволовых (камбиальных) клеток той или иной ткани. Основным аргументом в пользу этого предположения является то, что, поскольку стволовые тканевые (камбиальные) нормальные клетки являются долгоживущими, вероятность накопления в них мутаций сравнительно высока, что в конечном итоге может привести к формированию у них злокачественного фенотипа. Такие клетки при симметричном и асимметричном делении обеспечивают развитие опухоли [33; 12; 42; 26; 8].

Около 20 лет назад Steel G. G. и Stephens T. C. (1983 г.) высказали и обосновали предположение о том, что метастазы формируются при отсеивании из опухоли именно стволовых опухолевых клеток, в то время как персистирующие субклоногенные и неклоногенные опухолевые клетки не играют существенной роли в генерализации опухолевого процесса вследствие ограниченного или исчерпанного пролиферативного потенциала [36]. Интересно, что в большинстве доброкачественных опухолей не удавалось выявить клоногенных клеток, что может быть связано как с их малым содержанием, так и с невозможностью «вывести» их

in vitro из фазы покоя (Go), а также с длительным клеточным циклом. Эти предположения не лишены оснований, так как образование кластеров при клонировании клеток доброкачественных опухолей часто все-таки наблюдалось. Но если учесть вышесказанное, то не исключено, что сам факт клонированности опухоли может стать критерием злокачественности (в частности, для пограничных и высокодифференцированных опухолей) [11; 20].

Стволовые (клоногенные) опухолевые клетки, вероятно, представляют собой «глубокий резерв» опухоли в состоянии покоя (Go) и как следствие являются наиболее радио- и химиорезистентной клеточной популяцией. Следовательно, эффективность любого противоопухолевого воздействия определяется тем, достигнута ли с помощью него полная стерилизация стволовых опухолевых клеток, т. к. именно они обеспечивают репопуляцию после завершения химио / лучевой терапии и как следствие рецидивирование и генерализацию опухолевого процесса [1; 28; 37; 39; 41]. Так исследование кривых доза-эффект радиационной гибели клоногенных клеток позволило предположить, что для некоторых типов опухолей время безрецидивного лечения после лучевой терапии коррелирует с радиочувствительностью клоногенных клеток, а вероятность полного локального контроля определяется их исходной долей в опухоли [39]. Поэтому оценка доли, степени радио- и химиочувствительности стволовых клоногенных клеток опухоли — один из реальных путей индивидуализации радио- и химиотерапии. Исследования в этом направлении были выполнены в 1980–90-е гг. [31; 27] и возобновлены на новом «витке» в настоящее время [13; 17].

Первая проблема, с которой столкнулись исследователи, — выделение достаточного (для клонирования и дальнейшего определения чувствительности к воздействиям) количества опухолевых клеток. Использованием разных подходов к механической дезагрегации в сочетании с энзиматическими коктейлями [9; 19; 32] давало возможность получать $5,0 \times 10^6$ – $1,0 \times 10^7$ живых опухолевых клеток из 1 г опухолевой ткани.

Большое количество работ было посвящено разработке условий клонирования с целью повышения эффективности последнего. При клонировании *in vitro*, кроме аминокислот и витаминов, использовали гормональные добавки [14; 30], липиды сои, холестерин, смесь микроэлементов [14], эпидермальный фактор роста [10]. В отсутствие в то время многих других цитокинов повышения ЭКО удавалось достигнуть при использовании (в качестве фидерного слоя) фибробластов и ФГА-стимулированных лейкоцитов [10]. ЭКО учитывали на 14–21-й дни культивирования, исключая из общего числа колоний конгломераты клеток, учет количества которых осуществляли на 2-е сут.

Учитывая технические и методические сложности выделения достаточного количества клеток для клонирования, невозможность сформировать подходящий коктейль из факторов роста (для культивирования) и истинно низкую клоногенную способность ряда со-

лидных опухолей, стволовые клоногенные клетки удавалось выявлять лишь в 60–85 % солидных новообразований.

Большой раздел исследований клоногенных опухолевых клеток в 1980–90-е гг. был посвящен изучению возможностей их использования для определения и прогнозирования индивидуальной чувствительности опухолей к различным консервативным воздействиям: радио-, иммуно- и в значительной мере — к химиотерапии. Описанные выше ограничения сужали круг опухолей, для которых можно определить индивидуальную реакцию на химиопрепараты. Дополнительным ограничением стало также и то, что достоверное представление об эффективности того или иного агента можно получить лишь при наличии в контроле не менее 30 колоний.

Тем не менее в ряде работ была подтверждена адекватность метода для индивидуального прогнозирования химиочувствительности и подбора на этой основе рациональных схем химиотерапии. Так, во-первых, наблюдалась вариабельность в реакции клоногенных клеток разных новообразований на химиопрепараты; во-вторых, доля новообразований разных локализаций и гистологических типов к тем или иным препаратам совпадала с общеклиническими представлениями о сравнительной чувствительности к химиотерапии этих опухолей в клинике; и, в-третьих, клоногенные клетки опухолей от больных, ранее получавших химиотерапию, были менее чувствительными к цитостатикам [7; 25].

Клиническая прогностическая сила индивидуального подбора препаратов по реакции клоногенных клеток на цитостатики оказалась сравнительно велика, особенно для выявления случаев индивидуальной резистентности (см. таблицу). Последний факт имеет объяснение: если клетки устойчивы к препаратам *in vitro*, то они с большой вероятностью будут резистентны к ним и в организме больного (имеются в виду препараты прямого действия, не требующие метаболической активации), т. к. *in vitro* снимается ряд ограничений для развития цитотоксического эффекта (в частности, нет ограничений для доступа препаратов к опухолевым клеткам). В то же время микроокружение опухолевых клеток *in vitro* отличается от такового в организме больного, поэтому прогноз чувствительности удастся в меньшем проценте случаев.

В отдельных исследованиях было показано, что противоопухолевая химиотерапия с учетом данных об индивидуальной химиочувствительности существенно улучшает результаты лечения [23; 24; 40]. Кроме того, следует ожидать, что исключение из схем лечения конкретных больных препаратов, к которым данная опухоль резистентна, позволит, с одной стороны, отдалить развитие перекрестной химиорезистентности, а, с другой, избавит больного от бесполезных (в плане противоопухолевого действия), но не безразличных для организма (в плане иммунодепрессивного действия) средств.

Все вышесказанное явилось обоснованием для выполнения собственных исследований в этом направ-

Результаты клинической апробации метода клонирования индивидуальной реакции опухолей человека на цитостатики

Тип опухоли	Количество наблюдений	Процент случаев с правильно предсказанной реакцией на цитостатики		№ источника информации
		По чувствительности	По резистентности	
Рак молочной железы	75	70	63	40
Рак легкого	168	60	90	25
Рак яичников	48	20	73	23
Рак мочевого пузыря	160	57	100	24

лении, которые были опубликованы в 90-е годы [2; 3; 6]. В качестве модели для апробации был выбран рак легкого человека. Исследовано 115 карцином легкого различных гистологических типов.

Для получения опухолевых клеток были разработаны 5 методов дезагрегации опухолевой ткани, включающих различные варианты сочетания механической и многоэтапной ферментной обработки, что давало возможность получать не менее $6,0 \times 10^6$ одиночных жизнеспособных опухолевых клеток из 1 г ткани.

Были исследованы 4 подхода к клонированию опухолевых клеток в полужидком агаре: *in vivo* — в диффузионных камерах, помещаемых в брюшную полость иммунодепрессированных животных, и 3 *in vitro* — в ч. Петри и капиллярах. В зависимости от количества выделенных клеток клонирование осуществляли одним или несколькими методами.

По величине выявленной ЭКО опухоли различались в 1000 раз. Максимальная ЭКО составляла 0,1 %, средняя для всей совокупности карцином — 0,01 %, т. е. в среднем 1 из 10000 клеток демонстрировала неограниченный пролиферативный потенциал.

Показано, что из всех апробированных *in vitro* и *in vivo* подходов к клонированию наиболее выгодно клонирование в капиллярах, т. к. требует на порядок меньше опухолевых клеток и позволяет выявить в среднем в 3,5 раза больше клоногенных. Кроме того, при этом типе клонирования чаще удается подавить изначальную бактериальную и грибковую контаминацию опухолевого материала. Сам факт существенно большего ЭКО новообразований при клонировании в капиллярах представляется чрезвычайно важным. Во-первых, он является прямым доказательством того, что с помощью использованных подходов к клонированию удастся выявить лишь часть стволовых опухолевых клеток. Следовательно, величина ЭКО не может являться абсолютной биологической характеристикой опухоли. В то же время наблюдалась тенденция к увеличению ЭКО с уменьшением степени дифференцировки опухолей. Так в ряду высоко- умеренно- низкокодифференцированные раки ЭКО составляло 0,0085-0,034-0,02 %

(хотя в каждой из групп были опухоли с низким и высоким ЭКО). Более того, нельзя было не отметить, что максимальные значения ЭКО (до 0,1 %) наблюдались все-таки в группе мелкоклеточных раков легкого, клинически наиболее агрессивных.

Кроме того, мы обратили внимание на «неклонированность» большинства карциноидов легкого, многие из которых характеризуются доброкачественным течением. Анализ полученных результатов в сопоставлении с клиническими данными лег в основу способа уточняющей диагностики: опухолевые клетки истинных карциноидов с доброкачественным течением в описанных условиях колоний не образуют [4]. Сам факт клонированности свидетельствует о злокачественном характере карциноида, диморфности новообразования или низкодифференцированной опухоли другого гистологического типа, что подтверждалось окончательным патоморфологическим заключением. В то же время мы не считаем, что истинные карциноиды с доброкачественным течением не содержат клоногенных клеток. Одной из причин их «нулевой ЭКО» может быть большая длительность клеточного цикла или «законсервированность» (G_0) стволовых клеток в карциноидах. На это указывает выраженное кластерообразование опухолевыми клетками карциноидов в полужидком агаре и переход «отдельных кластеров в разряд колоний» при удлинении времени культивирования. Дальнейшее изучение кластеро/колониообразования, вероятно, с одной стороны, позволит подвести биологический фундамент под тезис клиницистов о том, что каждый карциноид несет в себе потенциал злокачественности, а, с другой стороны, выявить патофизиологические условия, которые приводят к стимуляции размножения стволовых клеток в организме больного.

Определенные результаты, касающиеся регуляции пролиферации клоногенных клеток, были получены и нами. Так, в частности, мы установили, что ЭКО одних и тех же опухолей в несколько раз выше в капиллярах, чем в ч. Петри. Мы предположили, что это может быть связано с нарастанием в них гипоксии в процессе культивирования, т. к. диффузия газов через торцовые поверхности капилляров очень мала. Это предположение в какой-то мере подтвердилось при клонировании в полузаполненных герметически закрытых капиллярах: ЭКО возростала еще на 50–300 %. Поэтому нельзя исключить, что степень гипоксии в опухоли больного может быть фенотипическим регулятором пролиферации стволовых опухолевых клеток.

В целом же исследование ЭКО, количества кластеров, соотношения колоний и кластеров, их величины и морфологии, а теперь и иммунофенотип, в том числе при разных воздействиях, — адекватный путь изучения регуляции пролиферации стволовых клеток.

Мы осуществили и апробацию различных подходов к клонированию для оценки индивидуальной чувствительности опухолей к цитостатикам, сравнив ее результаты с подкапсульным тестом. Прямое сопо-

ставление результатов показало высокую и сходную специфичность обоих подходов для выявления случаев индивидуальной химиорезистентности к тем или иным цитостатикам. Кроме того, было показано, что профиль чувствительности клоногенных и кластерообразующих клеток опухоли в состоянии пролиферации часто сходен [5].

Возрождение интереса к стволовым (клоногенным) опухолевым клеткам в последние годы имеет как теоретическую подоплеку, так и практическую направленность. Прежде всего, описание тканевых (камбиальных) стволовых клеток укрепило гипотезу о возможном происхождении стволовых опухолевых клеток от соответствующих тканевых предшественников. Действительно, последние являются долгоживущими, могут многократно делиться, и как следствие аккумулялировать в течение жизни мутации, которые (в соответствующем сочетании) могут привести к формированию их злокачественного фенотипа. Более общим теоретическим обоснованием интереса к стволовым клеткам в онкологии является то, что процессы, лежащие в основе эмбриогенеза, сходны с таковыми при регенерации тканей. А при развитии злокачественной опухоли в клетках реактивируется ряд эмбриональных механизмов, обеспечивающих ее рост, установление кровотока, распространение [22; 16; 34].

Общими чертами нормальных тканевых и опухолевых стволовых клеток является их способность к полуконсервативному делению. Показана и активация в нормальных и опухолевых стволовых клетках сходных сигнальных путей [33; 35]. Поэтому изучение механизмов активации генов при пролиферации и дифференцировке нормальных стволовых клеток, регулирующая роль цитокинов, гормонов и других биологически активных молекул — один их выходов на патогенетическую терапию рака, мишенью которой являются стволовые опухолевые клетки; она должна основываться на молекулярной и генетической классификациях опухолей.

В то же время сегодня пока не решен ряд фундаментальных вопросов, в частности:

— действительно ли потомки стволовых опухолевых клеток теряют «стволовость» (субклоногенные и «зрелые» опухолевые клетки);

— существует ли в опухоли иерархичность клеток по пролиферативным потенциалам, и какие клеточные механизмы за нее ответственны?

Если станут ясны механизмы, обеспечивающие переход стволовой клоногенной опухолевой клетки в коммитированную (субклоногенную), то активация этих механизмов могла бы обеспечить гибель всей опухоли.

Заключая, хотим отметить, что целью настоящей публикации было ознакомить коллег с данными, касающимися стволовых опухолевых клеток, полученными нами и различными научными группами около 20 лет назад, что, может быть, будет полезным при анализе современной литературы, посвященной этой теме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселева Е. Г. Гетерогенность опухоли и механизмы естественной резистентности при метастазировании // Экспер. Онкология. — 1988. — Т. 10, № 1. — С. 5–8.
2. Свиридова И. К., Мороз И. А., Сергеева Н. С. Сравнительная оценка двух способов клонирования опухолей легкого // Мед. радиол. — 1991. — № 11. — С. 22–24.
3. Сергеева Н. С., Свиридова И. К., Мороз И. А. Методические подходы к получению опухолевых клеток рака легкого с целью дальнейшего клонирования в полужидком агаре // Лаб. Дело. — 1991. — № 2. — С. 28–30.
4. Сергеева Н. С., Чиссов В. И., Свиридова И. К. и др. Способ уточняющей дифференциальной диагностики карциномидов легкого. — Изобрет. Патент N2033423, 1995.
5. Сергеева Н. С. Прогнозирование индивидуальной реакции злокачественных опухолей человека на лучевую и лекарственную терапию (экспериментальные исследования): Автореф. дис. ... д. биол. наук. Москва, 1991.
6. Чиссов В. И., Мороз И. А., Сергеева Н. С., Свиридова И. К. Клоногенная способность опухолевых клеток рака легкого человека // Экспер. онкол. — 1990. — Т. 12, № 5. — С. 56–59.
7. Albrecht M., Simon W. E., Holrel F. Individual in vitro chemosensitivity of human mammary and ovarian carcinoma cells // Aspekte Klin. Oncol. — 1984. — № 4. — P. 597.
8. Al-Hajj M., Clarke M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells // Oncogene. — 2004. — Vol. 23, № 43. — P. 7274–7282.
9. Allalunis-Turner I. I., Siemann D. F. Recovery of cell subpopulations from human tumor xenografts following dissociation with different enzymes // Brit J.Cancer. — 1986. — Vol. 54, № 14. — P. 615–622.
10. Ali-Osman F., Belts P. A. Optimization and characterization of the capillary human clonogenic cell assay // Cancer Res. — 1988. — Vol. 48, № 3. — P. 715–724.
11. Aogauchi R., Tsubota N., Ischil N. et al. The evaluation the drug sensitivity of lung cancer by colony formation test // Lung Cancer. — 1987. — Vol. 27, № 17. — P. 679–686.
12. Bapat S. A., Mali A. M., Koppicar C. B. et al. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer // Cancer Res. — 2005. — Vol. 65, № 8. — P. 3025–3029.
13. Behbod F., Rosen J. M. Will cancer stem cells provide new therapeutic targets? // Carcinogenesis. — 2005. — Vol. 26, № 4. — P. 703–711.
14. Bernabel P. A., Santini V., Dal Nozzo O. et al. Clonogenic growth of acute non-lymphocytic leukemia cells in serum-free medium // Experientia. — 1988. — Vol. 44, № 10. — P. 903–906.
15. Burns J. S., Abdallah B. M., Guldborg P. et al. Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase immortalized human mesenchymal stem cells // Cancer Res. — 2005. — Vol. 65, № 8. — P. 3126–3135.
16. Cheng T. Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells // Oncogene. — 2004. — Vol. 23, № 43. — P. 7256–7266.
17. Dean M., Fojo T., Bates S. Tumour stem cells and drug resistance // Nat. Rev. Cancer. — 2005. — Vol. 5, № 4. — P. 275–284.
18. Elprana D., Schwachofer J., Kuipers W. et al. In vitro chemosensitivity testing of squamous cell carcinoma of the head and neck, a preliminary report // Acta otolaryngo. — 1987. — Vol. 103, № 5-6. — P. 529–536.
19. Engelholm S. A., Thomen S. M., Brunner N. et al. Disaggregation of human solid tumors by combined mechanical and enzymatic methods // Br. J. Cancer. — 1985. — Vol. 51. — P. 93–98.
20. Findby H. W., Stenber C. P., Krischer J. P. et al. Pediatric oncology group study of in vitro clonal growth patterns of leukemic cells in children acute non-lymphocytic leukemia as a predictor of induction response // Cancer Res. — 1987. — Vol. 47. — P. 4225–4228.
21. Hamburger A. W., Salmon S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells // Sci. — 1977. — Vol. 197. — P. 461–469.
22. Hirschmann-Jax C., Foster A. E., Wulf G. G. et al. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells // Proc.Natl.Acad.Sci. USA. — 2004. — Vol. 101, № 39. — P. 14228–14233.
23. Inoue K. Division of clinical chemotherapy: chemosensitivity testing for human ovarian cancer on in vitro colony assay // Gan-no-Rinabo. — 1984. — № 30, (suppl. 9). — P. 1146–1151.
24. Kanomaru H., Hashimura T., Kakehi V. et al. Cloning ability tumor cells. Evaluation of chemosensitivity to drugs in vitro by means of cloning ability of tumor cells // Acta Urol. Jap. — 1988. — Vol. 34, № 11. — P. 1917–1921.
25. Kanzawa F., Matsushima Y., Ishihara J. L. et al. In vitro chemosensitivity patterns of carcinoma of the lung in human tumor clonogenic assay // J.Pharmacobiol. Dyn. — 1986. — Vol. 9, № 9. — P. 715–721.
26. Kopper L., Hajdu M. Tumor stem cells // Pathol. Oncol. Res. — 2004. — Vol. 10, № 2. — P. 69–73.
27. Kubota T., Kawamura E., Kurihara H. et al. Clinical study of clonogenic assays with reference to adjuvant cancer chemotherapy after operation // Nippon Gekai Gakkai Zasshi. — 1988. — Vol. 87, № 2. — P. 154–161.
28. Marie J-P., Thevanin D., Littoun R. In vitro sensitivity of normal and leukemic myeloid clonogenic cells to hyperthermia: absence of selective effect // Exp.Hematol. — 1989. — Vol. 17, № 17. — P. 809–811.
29. Mattox D. E., von Hoff D. D., Clar G. M. et al. Factors that influence growth of head and neck squamous carcinoma in the soft agar cloning assay // Cancer. — 1984. — Vol. 53. — P. 1736–1741.
30. Offestad L., Tveit K. M., Mifolt H. K. et al. Cultivation of breast carcinoma in soft agar. Experience with 237 fresh tumor specimen // Br. J. Cancer. — 1988. — Vol. 58, № 1. — P. 8–12.

31. *Ohinosti T., Hiraki S.* In vitro drug –sensitivity test using human tumor clonogenic assay in lung cancer patients // *Jap. J.Cancer.* — 1985. — Vol. 12, № 8. — P. 1582–1587.
32. *Pavelic Z. P., Slocum H., Rustum J. et al.* Colony growth in soft agar of human melanoma, sarcoma, lung carcinoma cells disaggregated by mechanical and enzymatic methods // *Cancer Res.* — 1980. — Vol. 40. — P. 2160–2164.
33. *Reya T, Morrison S. J., Clarke M. F. et al.* Stem cells, cancer, and cancer cells // *Nature.* — 2001. — Vol. 414. — P. 105–111.
34. *Sell S.* Stem cell origin of cancer and differentiation therapy // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* — 2004. — Vol. 51, № 1. — P. 1–28.
35. *Singh S. K., Clarke I. D., Hide T., Dirks P. B.* Cancer stem cells in nervous system tumors // *Oncogene.* — 2004. — Vol. 23, № 43. — P. 7267–7273.
36. *Steel G. G., Stephens T. C.* Stem cells in tumors // In: *Stem cells*, Ed. C.S.Potten, Edinburg — London-New-York, 1983. — P. 271.
37. Stem cells in neoplasia // *Lancet.* — 1989. — Vol.1, № 8640. — P. 701–702.
38. *Tam K. F., Ng Ty, Liu S. S. et al.* Potential application of the ATP cell viability assay in the measurement of intrinsic radiosensitivity in cervical cancer // *Gynecol.Oncol.* — 2005. — Vol. 96, № 3. — P. 755–770.
39. *Tucker S. L., Thames H. D.* The effect of patient-to-patient on the accuracy of predictive assays of tumor response to radiotherapy: a theoretical evaluation // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* — 1989. — Vol. 17, № 1. — P. 145–157.
40. *Werner A., Knopp C., Schulz B. et al.* First experiences with the human tumor stem cell assay culturing gynaecological and abdominal carcinomas // *Aspekte Klin Oncol.* — 1984. — P. 723.
41. *Wheldon M. E., Michalowski A. S.* Alternative models for the proliferative structure of normal tissue and their response to irradiation // *Brit. J.of Cancer.* — 1986. — Vol. 6, Suppl.7. — P. 382–384.
42. *Yuan X., Curtin J., Xiong Y. et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme // *Oncogene.* — 2004. — Vol. 23, № 58. — P. 9392–9400.

Поступила 23.01.2006.

УДК 57.083.3:615.371/.372

*Z. G. Kadagidze, A. I. Chertkova, E. G. Slavina***IMMUNOREGULATORY CD25⁺CD4⁺ T-CELLS***N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow***ABSTRACT**

Naturally occurring CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cells (Treg) play crucial role in negative control of host immune response in tumor growth, in allergy, transplantation, infection diseases. In review we present characteristics of main phenotypes markers and functional properties of Treg. Role of different factors which control their generation, homeostasis and function and also influence on antitumor immune response their reduction are discussed.

Key words: natural CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cells, antitumor immune response, vaccinotherapy.

*З. Г. Кадагидзе, А. И. Черткова, Е. Г. Славина***ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ CD25⁺CD4⁺ Т-КЛЕТКИ***ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва***РЕЗЮМЕ**

Решающую роль в негативном контроле иммунологической реактивности организма при опухолевом росте, аллергии, трансплантации и инфекционных заболеваниях играет популяция естественных регуляторных CD25⁺CD4⁺ Т-клеток (Трег). В обзоре представлена характеристика основных фенотипических признаков и функциональных свойств Трег. Рассматривается роль различных факторов, контролирующих развитие, гомеостаз и функционирование этих клеток, а также влияние подавления функции этих клеток на противоопухолевый иммунный ответ.

Ключевые слова: естественные регуляторные CD25⁺CD4⁺ Т-клетки, противоопухолевый иммунный ответ, вакцинотерапия опухолей.

ВВЕДЕНИЕ

Концепция иммунологического надзора за опухолевым ростом впервые была сформулирована McFarlane Burnet и Lewis Thomas. Они предположили, что иммунная система должна распознавать предраковые и раковые клетки как «не свои» и уничтожать их. Однако многие опухолеассоциированные антигены (ОАА) являются истинными аутоантигенами и распознаются иммунной системой за редким исключением как «свои», следовательно, иммунологические методы воздействия на опухолевый рост предполагают и борьбу с механизмами толерантности [22; 36]. В настоящее время ключевая роль в иммунологической защите организма от опухоли отводится Т-клеткам. Они, специфические в отношении ОАА, обнаруживаются как в крови, так и непосредственно в опухолевой ткани: значит, иммунная система способна распознавать опухоль. В то же время в подавляющем большинстве случаев иммунологический ответ на ОАА не приводит к регрессии опу-

холи, а результаты иммунотерапевтических методов, как правило, очень скромные [2; 20; 39; 42]. Опухоль обладает различными механизмами преодоления иммунологического надзора, а иммунная система способна как поражать опухолевые клетки, так и содействовать их росту [15; 45]. Многочисленные эксперименты на животных и клинические исследования показали, что большую роль в предупреждении эффективного иммунного ответа на опухоль играют механизмы периферической толерантности, ограничивающие способность антиген-специфических Т-клеток отвечать на опухолевые антигены. В настоящее время установлено, что важную роль в индукции не только ауто толерантности, но и толерантности к опухолевым клеткам играет немногочисленная популяция регуляторных (супрессорных) CD4⁺ Т-клеток, которые предупреждают развитие различных органо-специфических аутоиммунных поражений, а также способны эффективно подавлять противоопухолевый иммунитет [43; 57].

К настоящему времени накоплен огромный материал, свидетельствующий о том, что различные субпопуляции регуляторных Т-клеток: $CD4^+$, $CD8^+$, а также НКТ-клетки играют существенную роль в контроле аутоиммунных процессов, а также иммунного ответа на аллотрансплантаты, аллергены, инфекционные агенты и опухолевые клетки. Важно отметить, что различные субпопуляции Т-супрессоров экспрессируют разные рецепторы, используют разные эффекторные механизмы и функционируют на разных стадиях иммунного ответа [21; 25].

Регуляторные $CD4^+$ Т-клетки включают в себя естественные «профессиональные», продуцируемые тимусом полностью дифференцированные супрессорные клетки $CD25^+CD4^+$ Трег (Трег) [43] и регуляторные Т-клетки, возникающие из наивных или покоящихся периферических $CD4^+$ Т-клеток в процессе ответа на антиген: Tr1 и Th3-клетки (супрессорная активность обусловлена продуцируемыми ими IL-10 и TGF- β соответственно). Экстратимическая генерация регуляторных Т-клеток рассматривается в обзорах [16; 27]. Существующая концепция «естественных» и «адоптивных» регуляторных клеток указывает на разнообразие супрессорных Т-клеток в отношении их функции и развития. Как взаимодействуют эти различные типы иммунорегуляторных Т-клеток, пока остается неясным.

$CD25^+CD4^+$ Трег

Многочисленные исследования показывают, что решающую роль в обеспечении иммунологической аутопереносимости и негативном контроле как патологических, так и физиологических иммунных реакций играет популяция естественных $CD25^+CD4^+$ Трег. Элиминация или инактивация этих клеток вызывает развитие тяжелых аутоиммунных заболеваний, а также приводит к усилению иммунного ответа на аллоантигены и опухолевые клетки [43; 60]. Трег продуцируются тимусом как функционально зрелая популяция, сохраняющая стабильную функцию на периферии [24]. Они обнаруживаются в тимусе плода человека уже на 13-й, а вне тимуса — начиная с 14-й нед беременности [12]. С возрастом супрессорная активность $CD25^+CD4^+$ Трег у человека снижается [54]. Внутритимусное развитие этих клеток требует более высокой avidности взаимодействия их TCR с комплексом аутоантиген/МНС, экспрессируемым клетками стромы тимуса (главным образом эпителием кортикального слоя), чем требуется для позитивной селекции других Т-клеток, но меньшей, чем порог для негативной селекции. Значительное разнообразие TCR регуляторных Т-клеток и в тимусе, и на периферии свидетельствует о том, что эти клетки способны взаимодействовать практически с любым комплексом МНС-II-пептид в определенном диапазоне avidности [6; 29]. Акцессорные молекулы CD28, B7 и CD40, экспрессирующиеся на развивающихся тимоцитах и строме тимуса, также имеют большое значение для продукции Трег в тимусе [43; 50]. Постоянно экспрессирующаяся

на поверхности eТрег молекула CD28 необходима как для внутритимусной генерации Трег, так и для их обновления и выживания на периферии [51].

РОЛЬ *Foxp3/FOXP3* В РАЗВИТИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ Трег

В настоящее время центральная роль в развитии и функционировании Трег отводится гену *Foxp3* (у человека *FOXP3*), который кодирует транскрипционный репрессор — белок Scurfin. *Foxp3* является членом семейства генов *Forkhead (Fox)*, представляющих собой группу транскрипционных факторов, участвующих в процессах, ответственных за развитие организма, процессах метаболизма, развитии злокачественных опухолей и старении. Недавно было установлено, что они имеют большое значение для развития лимфоцитов и осуществления их эффекторной функции [26]. Мутации *Foxp3/FOXP3* являются причиной связанного с X-хромосомой мультиорганного аутоиммунного и воспалительного заболевания у человека (IPEX) и у Scurfy мышей. Эксперименты на мышах показали, что экспрессия *Foxp3* требуется для нормального развития Трег в тимусе. При отсутствии функционального *Foxp3* регуляторные Т-клетки не продуцируются, и такие мыши погибают в течение первых 3 нед жизни от тяжелых лимфопролиферативных нарушений. Инокуляция таким животным нормальных $CD4^+CD25^+$ Трег предупреждает развитие аутоиммунных и воспалительных процессов [18; 44]. Анализ экспрессии *Foxp3* mRNA и белка Scurfin показал их высокую экспрессию как в периферических $CD4^+CD25^+$ Трег клетках, так и в $CD4^+CD25^+CD8^-$ тимоцитах мышей. В то же время нерегуляторные тимоциты/Т-клетки, В- или NK-клетки не экспрессируют *Foxp3*. *Foxp3* не индуцируется в Т-клетках мышей после их активации. Трансдукция *Foxp3* в нерегуляторные *Foxp3^-* $CD25^-CD4^+$ «наивные» Т-клетки человека или мышей присваивает клеткам функциональные свойства и фенотип Трег [18; 59].

У человека *FOXP3^+CD25^+CD4^+* Трег-клетки были обнаружены в тимусе, в периферической крови взрослых людей и в крови из пупочного канатика [58]. Имеются сообщения о том, что, в отличие от опытов на мышах, активация *in vitro* $CD25^-CD4^+$ Т-клеток человека индуцирует у них экспрессию *FOXP3* и Трег-активность [56]. В то же время другие авторы не подтверждают этого факта [59]. Существует возможность того, что *Foxp3* по-разному функционирует у человека и мышей. В то время, как экспрессия *Foxp3* у мышей ограничивается регуляторными $CD4^+$ Т-клетками, у человека, помимо естественных регуляторных Т-клеток периферической крови, некоторые активированные несупрессивные клоны $CD4^+$ и $CD8^+$ экспрессируют *FOXP3* [35; 40]. Показано также, что у больных, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, леченных IL-2, в крови обнаруживаются $CD25^+CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие высокий уровень *FOXP3*, но проявляющие лишь слабую супрессорную активность [46]. Эти данные заставляют предположить, что

для развития истинных Трег у человека наряду с *FOXP3* требуется участие дополнительных, пока не установленных, факторов [18; 1]. Однако тот факт, что $CD25^+CD4^+$ Трег человека экспрессируют высокий уровень *FOXP3* [59; 40], а мутация или сниженная экспрессия *FOXP3* приводит к нарушению супрессорной функции Трег и развитию тяжелых аутоиммунных заболеваний, ясно свидетельствует о том, что этот фактор играет ключевую роль в гомеостазе иммунной системы организма. Интересно, что определенный процент Т-клеточных лейкозов/лимфом взрослых людей (ATLL) экспрессируют *Foxp3* [41].

Пока до конца не ясно, как *Foxp3* действует на молекулярном уровне. В экспериментах на мышах было показано, что *Foxp3* является мощным иммуносупрессивным геном, действуя как специфический транскрипционный корепрессор 2 ключевых транскрипционных факторов — NFAT (nuclear factor of activated T-cells) и NF- κ B, играющих основную роль в экспрессии генов ряда цитокинов, продуцируемых периферическими Т-клетками. Было высказано предположение, что индукция *Foxp3* в разных типах клеток является главным механизмом негативной иммунной регуляции путем подавления продукции воспалительных цитокинов [7]. Однако до сих пор транскрипционная программа и гены-мишени *Foxp3* полностью не охарактеризованы.

РОЛЬ IL-2 В РАЗВИТИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ Трег

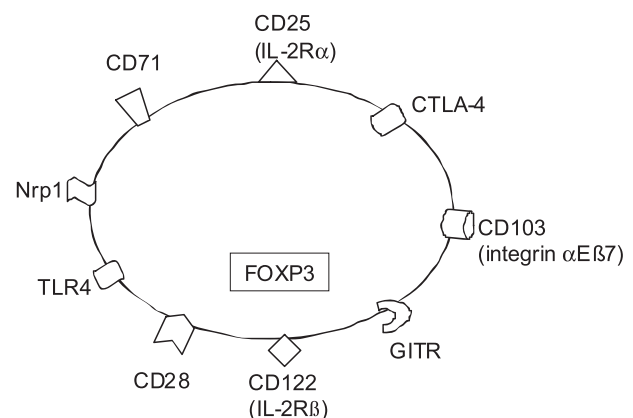
В функциональном развитии и выживании на периферии Трег большую роль играет IL-2. Отсутствие у мышей функциональных генов IL-2, IL-2R α или IL-2R β или нейтрализация циркулирующего IL-2 анти-IL-2 мАТ приводит к развитию летальных лимфопролиферативных нарушений, сопровождающихся тяжелыми аутоиммунными поражениями, и к селективному снижению или полному отсутствию *Foxp3*-экспрессирующих $CD25^+CD4^+$ Т-клеток в тимусе и на периферии. Коррекция продукции IL-2 у таких мышей ведет к подавлению неконтролируемой пролиферации Т-клеток и аутоиммунных процессов. Взаимодействие IL-2 с IL-2R необходимо для образования Трег в тимусе, экспансии этих клеток на периферии и осуществления ими супрессорной функции. Главным физиологическим источником IL-2 для поддержки на периферии Трег, очевидно, являются другие Т-клетки, особенно активированные $CD25^-CD4^+$ Т-клетки, включая аутореактивные. IL-2 обеспечивает негативную обратную связь между Трег и эффекторными Т-клетками (эТ): IL-2, секретлируемый эТ, поддерживает и активирует Трег, а последние подавляют продукцию IL-2 эффекторными Т-клетками [5; 47; 52]. Это свойство IL-2, в настоящее время применяемого при лечении рака почки и меланомы, может мешать его терапевтическому эффекту.

ОСНОВНЫЕ МАРКЕРЫ Трег

Трег периферической крови постоянно экспрессируют различные поверхностные молекулы, характер-

ные для активированных клеток или клеток «памяти». $CD45RB^{low}$ у мышей и $CD45RO^+$ у человека, $CD25$ — α -цепь рецептора IL-2 (IL-2R α), $CD122$ (IL-2R β), $CD71$ (рецептор трансферрина), $GITR$ (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene), HLA-DR, CCK8 (рецептор хемокина CCL1), а также внутриклеточный CTLA-4 ($CD152$). Хотя практически ни один из этих маркеров не является уникальным для $CD4^+$ Трег, постоянный характер и уровень экспрессии дают возможность использовать их для характеристики, выделения и исследования этих клеток. Недавно Bruder et al. в опытах на мышах идентифицировали на поверхности $CD25^+CD4^+$ Трег рецептор для *semaphorin III* — *neuropilin-1* (Nrp1), который является важным модулятором функции VEGF в процессе ангиогенеза. Авторы показали, что экспрессия Nrp1 на поверхности Трег коррелирует с экспрессией *Foxp3* и супрессорной функцией. Экспрессия Nrp1 на нерегуляторных Т-клетках после активации снижается [16]. Совершенно очевидно, что знание специфических маркеров регуляторных Т-клеток необходимо для разработки методов эффективной иммунотерапии опухолей (см. рисунок).

$CD25$ является наиболее специфическим маркером естественных регуляторных Т-клеток, однако он экспрессируется и на любых Т-клетках после активации. По данным разных авторов, у человека около 30 % $CD4^+$ Т-клеток экспрессируют $CD25$. Большинство этих клеток имеют низкий или средний уровень экспрессии $CD25$ и только 1-3% — высокий [4; 58]. Исследования *in vitro* $CD25^{int}$ и $CD25^{high}$ -популяций показали, что супрессорной активностью обладали главным образом $CD4^+$ Т-клетки, имевшие высокую постоянную экспрессию $CD25$ [4; 32]. Являясь рецептором IL-2, $CD25$ имеет важное значение для развития и функционирования естественных $CD25^+CD4^+$ Трег. У $CD25^{-/-}$ мышей Трег не возникают [19]. Наличие $CD25$ на значительном количестве $CD4^+$ Т-клеток периферической крови человека затрудняет выделение чистой популяции еТрег, что следует учитывать при оценке данных, касающихся их супрессорного потенциала. Следует отметить также, что имеются сообщения о существовании $CD25^-CD4^+$ Т-клеток, проявляющих супрессорную активность [11].



Некоторые поверхностные и внутриклеточные маркеры $CD25^+CD4^+$ Трег

GITR. Эта молекула постоянно экспрессируется на Трег, но ее экспрессия, как и экспрессия других маркеров *e*Трег, повышается на активированных нерегуляторных Т-клетках. Имеются сообщения как о блокаде ингибиторной активности Трег анти-*GITR* моноклональными антителами, так и об отсутствии их влияния на нее. Высказываются предположения, что антисупрессорный эффект анти-*GITR* мАТ обусловлен связыванием *GITR* на активированных, а не на Трег клетках, что делает первые резистентными к супрессии [49]. *GITRL* (лиганд *GITR*) экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (АПК) — дендритных клетках (ДК), макрофагах и В-клетках. Его экспрессия снижается в процессе их созревания. Характер распределения *GITR* на активированных и регуляторных Т-клетках и *GITRL* на АПК предполагает их комплексное динамическое взаимодействие, характер которого пока не вполне ясен.

CTLA-4 (CD152) постоянно экспрессируется на высоком уровне внутри и на низком, на поверхности $CD25^+CD4^+$ Трег человека. После стимуляции TCR экспрессия этого маркера повышается и сохраняется на высоком уровне в течение длительного времени. Напротив, $CD25^+CD4^+$ Т-клетки экспрессируют *CTLA-4* только после стимуляции и очень непродолжительное время [14]. Данные о роли этой молекулы в функционировании Трег противоречивы. Имеются сообщения как об отсутствии зависимости супрессорной активности Трег от экспрессии *CTLA-4* [30], так и о необходимости этой молекулы для ее осуществления [8]. Изучение роли *CD80* и *CD86* в модуляции функции *e*Трег при взаимодействии этих молекул с *CD28* и *CTLA-4*, проведенное Zheng Y. et al. [61], показало, что в процессе ответа Т-клеток человека на антигены аллогенных ДК блокада *CD86* или *CD28* повышала супрессорную функцию $CD25^+CD4^+$ Трег, в то время, как блокада *CD80* или *CTLA-4* ее ослабляла и повышала пролиферативный ответ. Предполагается, что *CD80* и *CD86* оказывают противоположное влияние на Трег через *CD28* и *CTLA-4*. Показано также, что опухоли, экспрессирующие *CD80*, могут обладать более выраженным толерогенным потенциалом, чем экспрессирующие *CD86* [31]. Вопрос об уникальных ингибиторных молекулах регуляторных Т-клеток до сих пор окончательно не решен. Скорее всего, специализированные функции Трег могут быть результатом действия известных молекул, совместно генерирующих супрессорный фенотип.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ Трег

Анализ функциональных особенностей Трег показал значительное сходство этих клеток у человека и грызунов. Характерным свойством Трег является анергия *in vitro*: они не пролиферируют ни при поликлональной, ни при антиген-специфической стимуляции. Анергия может быть частично преодолена достаточно сильными стимулами: высокими дозами *IL-2* или анти-*CD28* или использованием зрелых дендрит-

ных клеток в качестве АПК. Отмена анергии, вызываемая *IL-2*, не приводит, как полагали ранее, к отмене супрессорной способности Трег [52]. После прекращения действия этих стимулов Трег вновь возвращаются к состоянию анергии. Напротив, *in vivo* Трег, по-видимому, имеют высокую скорость возобновления [16]. После антигенной стимуляции они заселяют дренирующие лимфатические узлы, где и пролиферируют. Специфический хоминг и Ag-зависимая пролиферация необходимы для эффективного подавления локального иммунного ответа регуляторными Т-клетками [48; 55].

Изучение $CD25^+CD4^+$ Т-клеток человека на клональном уровне показало, что только те клоны $CD25^+CD4^+$ Т-клеток, которые были в условиях *in vitro* (а) анергичными, (б) не пролиферировали в ответ на обычные дозы цитокинов (*IL-2/IL-15*) и (с) имели высокую постоянную экспрессию *CD25*, обладали супрессорной активностью [32].

Для проявления супрессорной активности естественным Трег требуется антиген-специфическая или поликлональная стимуляция их TCR и, как сейчас стало очевидно, *IL-2*. Будучи активированными, они подавляют Т-клеточный ответ не только на антиген, использованный для активации, но и на другие антигены [53]. Клетками-мишенями Трег являются как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клетки, а также NKT- и NK- клетки. *In vitro* они подавляют пролиферацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, продукцию ими *IL-2* и цитотоксическую активность NK- и NKT- клеток контактозависимым и дозозависимым путем. Сведения о продукции регуляторными Т-клетками цитокинов и об их роли в супрессорной функции Трег противоречивы. Скорее всего, *in vivo* действует не один механизм, и цитокины могут в определенных ситуациях участвовать в осуществлении супрессии [55]. Так, например, имеются сообщения о том, что для подавления активности опухолеспецифических $CD8^+$ Т-клеток необходимо наличие у них интактного TGF- β RII [10]. Показано также, что $CD25^+CD4^+$ Трег способны *in vitro* индуцировать супрессорную активность у $CD25^+CD4^+$, которые начинают продуцировать TGF- β или *IL-10* и подавляют активацию “наивных” Т-клеток цитокинзависимым способом. Обнаружение этого феномена может прояснить противоречия в данных, полученных в исследованиях *in vivo*, и в определенной степени объяснить, каким образом небольшая популяция клеток может регулировать функционирование значительно более многочисленной популяции Т-клеток-респондеров *in vivo* [13; 28]. Показано также, что TGF- β играет большую роль в обеспечении гомеостаза *e*Трег на периферии, регуляции экспрессии *Foxp3*, а также является медиатором передачи сигналов, необходимых для поддержки супрессорной активности Трег [34]. Однако механизмы, лежащие в основе функционирования Трег, в настоящее время до конца не ясны. Они подробно рассматриваются в обзоре von Boehmer [55].

Трег И ИММУНОТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

В онкологии функционированию супрессорных клеток, подавляющих активность специфических ЦТЛ, придается особое значение. Одним из современных направлений терапии злокачественных новообразований является поиск путей преодоления толерантности к аутоантигенам, экспрессированным на поверхности опухолевых клеток. Один из подходов к решению этой проблемы — подавление функции клеток, ингибирующих иммунологический ответ на них. В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что при большинстве злокачественных опухолей (рак легкого, желудка, яичников, молочной железы, пищевода и др.) увеличивается популяция регуляторных Т-клеток до 12-21 % [43]. В то же время необходимо отметить, что это увеличение более характерно для больных распространенными заболеваниями, в то время как на ранних стадиях увеличение Трег незначительно. Так, например, при анализе количественного содержания Трег среди лимфоцитов, инфильтрирующих слизистую оболочку желудка в норме и при раке, практически не обнаружено различий в их содержании у больных ранними стадиями рака и другими заболеваниями желудка. В то же время при распространении опухоли и появлении метастазов в периферических лимфатических узлах уровень Трег значительно повышается [23].

Особое значение исследование функции этой популяции клеток имеет при различных видах иммунотерапии опухолей. Отсутствие эффективного опухоле-специфического иммунного ответа связывают с дефицитом функции антигенпрезентирующих клеток или толерантностью Т-клеток к ассоциированным с опухолью антигенам. Постулируется, что $CD4^+CD25^+$ клетки снижают эффективность противоопухолевых ЦТЛ, влияя в то же время на аутоиммунные реакции. Полагают, что разрушение иммунологической толерантности может быть одним из эффективных путей индукции противоопухолевого иммунного ответа. В связи с этим был проведен ряд исследований по изучению влияния удаления этих клеток на противоопухолевый иммунный ответ. Показано, что уменьшение количества Трег приводит к активации молчащих $CD8^+$ Т-клеток, а также неспецифических НК-подобных эффекторных клеток. Так, было исследовано влияние анти- $CD25$, - $CD4$, - $CD8$ и -NK мАТ на индукцию противоопухолевого иммунного ответа к опухолевым клеткам ST26 (HLA-II — негативная опухоль толстого кишечника мышей). Оказалось, что иммунизация АН-1 (пептид из клеток ST26) не защищала животных от развития опухоли, т. е. введение антигена не было достаточным для развития противоопухолевого иммунного ответа. В то же время после удаления $CD4^+$ Т-клеток все иммунизированные животные были живы, а удаление $CD8^+$ не влияло на выживаемость мышей. Чтобы подтвердить, что именно $CD4^+CD25^+$ клетки играют

основную роль в развитии этого эффекта, части мышей за 4 дня до введения разрешающей дозы опухолевых клеток вводили анти- $CD25$ мАТ. Оказалось, что все животные этой группы были защищены от развития опухоли, причем даже те, кому иммунизация не проводилась. Для того, чтобы подтвердить ингибирующую роль $CD25^+$ клеток, авторы осуществили адоптивный перенос этой популяции клеток. Мышам, иммунизированным АН-1 и получившим анти- $CD4$ мАТ, вместе с разрешающей дозой опухолевых клеток вводили 5×10^6 $CD25^+$ клеток. Оказалось, что адоптивный перенос $CD25^+$ Т-клеток отменяет защитный эффект, наблюдаемый у иммунизированных мышей с удаленными $CD4^+$ клетками. Таким образом, на этой модели было четко показано, что $CD25^+$ Т-клетки являются главными ингибиторами индукции противоопухолевого иммунитета [9]. Далее было показано, что, если вводить мышам опухолевые клетки через 50 дней после удаления $CD25^+$ клеток, все животные гибнут. Оказалось, что к этому времени количество $CD25^+$ клеток в организме животных восстанавливается, т. е. защитный эффект проявляется в короткий промежуток времени сразу после удаления этой популяции клеток. Эти и ряд других аналогичных данных позволяют предположить, что ингибция $CD25^+$ Трег может благотворно влиять на индукцию противоопухолевого иммунного ответа при комбинации с различными методами вакцинотерапии. В то же время удаление $CD25^+$ Т-клеток на длительный срок опасно в связи с риском развития аутоиммунных процессов, к тому же это может приводить к уменьшению количества активированных лимфоцитов, в том числе неспецифических противоопухолевых $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, что может способствовать опухолевому росту.

В ряде исследований показано, что у онкологических больных увеличенное количество $CD4^+CD25^+$ клеток сопровождается высокой экспрессией на них СТЛА-4. Получение мАТ к СТЛА-4 позволило проводить исследования по изучению влияния удаления этой популяции клеток на опухолевый рост как в эксперименте, так и в клинике. Введение мАТ к СТЛА-4 в дозе 0,5 мг/кг больным метастатическим раком простаты приводило к снижению уровня простатического антигена у гормон-резистентных больных [17]. Введение мАТ MDX-100 в дозе 3 мг/кг больным метастатической меланомой до вакцинотерапии (антиген, выделенный из клеток меланомы с адьювантами) привело к клиническому эффекту у 3 из 14 больных (2 полных и 1 частичный). Однако у 6 больных было отмечено развитие аутоиммунных реакций [37]. Необходимо отметить, что удаление СТЛА-4⁺ клеток может быть недостаточно для отмены супрессорной активности Трег: в экспериментальных исследованиях было показано, что Трег “нокаутированных” по СТЛА-4 мышей оставались способными подавлять иммунный ответ.

Другим подходом к ингибции активности Трег является использование малых доз циклофосфида (Цф). Еще в 80-х гг. было показано, что малые дозы Цф способны усиливать противоопухолевый иммун-

ный ответ. Оказалось, что введение Цф в дозе 2 мг/мышь уменьшало количество CD4⁺CD25⁺ клеток в л/у и селезенке мышей. Снижение начиналось через 24 ч после введения (на 14 %) и достигало максимума на 4-й день (50 %), а затем начиналось постепенное восстановление числа Трег и к 10-му дню их количество возвращалось к исходному уровню. Кроме того, среди CD4⁺CD25⁺ Т-клеток после введения Цф снижалось количество клеток, экспрессирующих GITR и CTLA-4. Трег от мышей, леченных Цф, в значительно меньшей степени ингибировали пролиферативный ответ CD8⁺ и CD25⁻CD4⁺ клеток и были более чувствительны к индукции апоптоза *in vitro* и *in vivo* [33]. Таким образом, перспективным для применения вакцинотерапии является период с 4-го по 10-й дни после введения Цф.

Экспериментальные исследования с использованием CD4-дефицитных мышей показали, что адоптивный перенос CD25⁻CD4⁺ совместно со специфическими противоопухолевыми CD8⁺ Т-клетками и вакциной (меланомный антиген gp100) приводил к развитию аутоиммунных реакций и регрессии развившейся меланомы. Перенос CD4⁺ Т-клеток, которые включали в себя смесь CD25⁺CD4⁺ и CD25⁻CD4⁺ Т-клеток или только Трег клеток, подавлял эффект адоптивной иммунотерапии. Сохранение количества и функции CD8⁺ клеток зависело от способности клеток-хелперов продуцировать ИЛ-2, на что указывают данные об отсутствии эффекта терапии, когда Т-хелперы были получены от мышей, не продуцирующих ИЛ-2 [3]. Эти данные указывают на то, что Т-хелперы могут способствовать снятию толерантности к персистирующим антигенам и разрушению уже развившейся опухоли, но эффект проявляется только при одновременном отсутствии Трег. Данные о повышении количества Трег у больных меланомой, иммунизированных различными вакцинами, в том числе gp100, еще раз указывают на необходимость подавления функции этой популяции в процессе вакцинотерапии. В этом также убеждают данные, полученные Prasad et al. [38], исследовавших эффективность различных вакцин на основе дендритных клеток в зависимости от присутствия Трег. Вакцинация проводилась (а) дендритными клетками, (б) клетками меланомы, обработанными тепловым шоком и γ -облучением, и (в) ДК, нагруженными этими клетками. Части мышей в день 0 вводили 100 мкг МАТ РС61 против CD25⁺ клеток. Удаление CD25⁺ клеток способствовало торможению опухолевого роста, особенно в группе мышей, получивших классический вариант дендритной вакцины: ДК+клетки меланомы. Следует отметить, что повторное введение через 90 дней интактных опухолевых клеток животным, у которых опухоли не развились, выявило сохранение противоопухолевого эффекта, что, возможно, связано с развитием Т-клеток памяти. Таким образом, удаление иммунорегуляторных Т-клеток можно рассматривать как одно из перспективных направлений повышения эффективности вакцинотерапии.

ВЫВОДЫ

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования установили важную роль, которую регуляторные Т-клетки играют в модуляции иммунологической реактивности организма при опухолевом росте, аллергии, трансплантации и инфекционных заболеваниях. CD25⁺CD4⁺ Трег способны вызывать значительное подавление иммунного ответа и индуцировать толерантность к аутоантигенам, в том числе опухолевым. Показано повышение количества Трег у животных с опухолью и у онкологических больных. Удаление или нарушение активности этих клеток может приводить к торможению опухолевого роста. Подавление активности регуляторных Т-клеток и одновременная стимуляция противоопухолевых клеток-эффекторов является важным современным направлением в терапии онкологических больных. Определение механизмов супрессии, выявление специфических маркеров и факторов, регулирующих функционирование Трег, может явиться ключом к успеху в иммунотерапии злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allan S. E., Passerini L., Bacchetta R. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs // J. Clin. Invest. — 2005. — Vol. 115. — P. 3276–3284.
2. Anichini A., Vegetti C., Mortarini R. The paradox of T-cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma // Cancer Immunol. Immunother. — 2004. — Vol. 53. — P. 855–864.
3. Antony P. A., Piccirillo C. A., Akpınarlı A. et al. CD8⁺T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells // J. Immunol. — 2005. — Vol. 174. — P. 2591–2601.
4. Baecher-Allan C., Brown J. A., Freeman G. J. et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167. — P. 1245–1253.
5. Bayer A. L., Yu A., Adeegbe D., Malek Th. R. Essential role for interleukin-2 for CD4⁺CD25⁺T regulatory cell development during the neonatal period // J. Exp. Med. — 2005. — Vol. 201. — P. 769–777.
6. Bensinger S. J., Bandeira A., Jordan M. S. et al. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4⁺25⁺ immunoregulatory T cells // J. Exp. Med. — 2001. — Vol. 194. — P. 427–438.
7. Bettelli E., Dastrange M., Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102. — P. 5138–5143.
8. Birebent B., Lorho R., Lechartier H. et al. Suppressive properties of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression // — 2004. — Vol. 34. — P. 3485–3496.

9. Casares N., Arribillaga L., Sarobe P. et al. CD4⁺/CD25⁺ Regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4⁺ T cells with IFN- γ -dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 171. — P. 5931–5939.
10. Chen M-L., Pittet M. J., Gorelik L. et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102. — P. 419–424.
11. Curotto de Lafaille M. A., Lafaille J. J. CD4⁺ regulatory T cells in autoimmunity and allergy // — 2002. — Vol. 14. — P. 771–778.
12. Darrasse-Jeze G., Marodon G., Salomon B. L. et al. Ontogeny of CD4⁺CD25⁺ regulatory/suppressor T cells in human fetus // *Blood.* — 2005. ?Vol. 105. — P. 4715–4721.
13. Dieckmann D., Bruett C. H., Ploettner H. et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 196. — P. 247–253
14. Dieckmann D., Ploettner H., Berchtold S. et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood // *J. Exp. Med.* — 2001. — Vol. 193. ?P. 1303–1310.
15. Dunn G P., Old L J., Schreiber R D. The three Es of cancer immunoediting // *Annu. Rev. Immunol.* — 2004 — Vol. 22. — P. 329–360.
16. Fehürvari Z., Sakaguchi S. CD4⁺ Tregs and immune control // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 1209–1217.
17. Fong L., Rini B., Kavanaugh B. et al. CTLA-4 blockade-based immunotherapy for prostate cancer // *J. Clin. Oncol.* — 2004. — Vol. 22. — 14S. — 2590.
18. Fontenot J. D., Rudensky A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3 // *Nat. Immunol.* — 2005. — Vol. 6. — P. 331–337.
19. Furtado G. C., Curotto de Lafaille M. A., Kutchukhidze N. et al. Interleukin 2 signaling is required for CD4⁺ regulatory T cell function // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 196. — P. 851–857.
20. Gerloni M., Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity // *Springer Semin. Immun.* — 2005. — Vol. 27. — P. 37–48.
21. Horwitz D. A., Gray J. D., Zheng G. The potential of human regulatory T cells ex vivo as a treatment for lupus and other chronic inflammatory diseases // *Arthritis Res.* — 2002. — Vol. 4. — P. 241–246.
22. Houghton A. N., Guevara-Patico J. A. Immune recognition of self in immunity against cancer // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 468–471.
23. Ichihara F., Kono K., Takahashi A. et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers // *Clin. Cancer Res.* — 2003. — Vol. 9. — P. 4404–4408.
24. Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N. et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 162. — P. 5317–5326.
25. Jiang H., Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 1198–1208.
26. Jonsson H., Peng S.L. Forkhead transcription factors in immunology // *Cell mol. life sci.* — 2005. — Vol. 62. — P. 397–409.
27. Jonuleit H., Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 171. — P. 6323–6327.
28. Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H. et al. Infectious tolerance: human CD25⁺ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4⁺ T helper cells // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 196. — P. 255–260.
29. Jordan M. S., Boesteanu A., Reed A. J. et al. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide // *Nat. Immunol.* — 2001. — Vol. 2. — P. 301–306.
30. Kataoka H., Takahashi S., Takase K. et al. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4 // — 2005. — Vol. 17. — P. 421–427.
31. LaBelle J. L., Hanke C. A., Blazar B. R. et al. Negative effect of CTLA-4 on induction of T-cell immunity in vivo to B7-1+, but not B7-2+, murine myelogenous leukemia // *Blood.* — 2002. — Vol. 99. — P. 2146–2153.
32. Levings M. K., Sangregorio R., Sartirana C. Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 196. — P. 1335–1346.
33. Lutsiak M. E., Semnani R. T., De Pascalis R. et al. Inhibition of CD4⁺25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide // *Blood.* — 2005. — Vol. 105. — P. 2862–2868.
34. Marie J. C., Letterio J. J., Gavin M., Rudensky A. Y. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells // *J. Exp. Med.* — 2005. — Vol. 201. — P. 1061–1067.
35. Morgan M. E., van Bilsen J. H., Bakker A. M. et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans // — 2005. — Vol. 66. — P. 13–20.
36. Nagorsen D., Scheibenbogen C., Marincola F. M. et al. Natural T cell immunity against cancer // *Clin. Cancer Res.* — 2003 — Vol. 9. — P. 4296–4303.
37. Phan G. Q., Yang J. C., Sherry R. M. et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 8372–8377.
38. Prasad S. J., Farrand K. J., Matthews S. A. et al. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells // *J. Immunol.* — 2005. — Vol. 174. — P. 90–98.

39. *Riddel S. R.* Finding a place for tumor-specific T cells in targeted therapy // *J. Exp. Med.* — 2004. — Vol. 200. — P. 1533–1537.
40. *Roncador G., Brown P. J., Maestre L. et al.* Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level // — 2005. — Vol. 35. — P. 1681–1691.
41. *Roncador G., Garcia J. F., Garcia J. F. et al.* FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma // — 2005. — Vol. 19. — P. 2247–2253.
42. *Rosenberg S. A., Sherry R. M., Morton K. E.* Tumor progression can occur despite the Induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8⁺ T Cells in patients with melanoma // *J. Immunol.* — 2005. — Vol. 175. — P. 6169–6176.
43. *Sakaguchi S.* Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self // *Nat. Immunology.* — 2005 — Vol. 6. — P. 345–352.
44. *Sakaguchi S.* The origin of FOXP3-expressing CD4⁺ regulatory T cells: thymus or periphery // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 112. — P. 1310–1312.
45. *Schreiber R. D.* Cancer Vaccines 2004 opening address: The molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting // *Cancer Immunity.* — 2005. — Vol. 5. — Suppl.1. — P. 1–8.
46. *Sereti I., Imamichi H., Natarajan V. et al.* In vivo expansion of CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ T cells expressing foxP3 in IL-2-treated HIV-infected patients // — 2005. — Vol. 115. — P. 1839–1847.
47. *Setoguchi R., Hori S., Takahashi T., Sakaguchi S.* Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization // *J. Exp. Med.* — 2005. — Vol. 201. — P. 723–735.
48. *Siegmund K., Feuerer M., Siewert Ch. et al.* Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo // *Blood.* — 2005. — Vol. 106. — P. 3097–3104.
49. *Stephens G. L., McHugh R. S., Whitters M. J., Young D. A.* Engagement of glucocorticoid-Induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4⁺CD25⁺ T Cells // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 173. — P. 5008–5020.
50. *Tai X., Cowan M., Feigenbaum L., Singer A.* CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2 // — 2005. — Vol. 6. — P. 152–162.
51. *Tang Q., Henriksen K. J., Boden E. K. et al.* Cutting Edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 171. — P. 3348–3352.
52. *Thornton A. M., Donovan E. E., Piccirillo C. A., Shevach E. M.* Cutting Edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 172. — P. 6519–6523.
53. *Thornton A. M., Shevach E. M.* Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164. — P. 183–190.
54. *Tsaknariadis L., Spencer L., Culbertson N. et al.* Functional assay for human CD4⁺CD25⁺ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity // *J. Neurosci. Res.* — 2003. — Vol. 74. — P. 296–308.
55. *von Boehmer H.* Mechanisms of suppression by suppressor T cells // *Nat. Immunol.* — 2005. — Vol. 6. — P. 338–344.
56. *Walker M. R., Kasprowicz D. J., Gersuk V. H. et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁺ T cells // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 112. — P. 1437–1443.
57. *Wei W. Z., Morris G. P., Kong Y. C.* Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells // — 2004 — Vol. 53. — P. 73–78.
58. *Wing K., Ekmark A., Karlsson H. et al.* Characterization of human CD25⁺CD4⁺ T cells in thymus, cord and adult blood // — 2002. — Vol. 106. — P. 190–199.
59. *Yagi H., Nomura T., Nakamura K. et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells // *Int. Immunol.* — 2004. — Vol. 16. — P. 1643–1656.
60. *Yu P., Lee Y., Liu W. et al.* Intratumor depletion of CD4⁺ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors // *J. Exp. Med.* — 2005. — Vol. 201. — P. 779–791.
61. *Zheng Y., Manzotti C.N., Liu M. et al.* CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 172. — P. 2778–2784.

Поступила 30.01.2006.

УДК 577.113:612.014.24(048.8)

*D. Yu. Blokhin***DYNAMIC STRUCTURE OF CHROMATIN (REVIEW)***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow***ABSTRACT**

The data summarized in this review describe the modern representations of eukaryotic cells chromatin structure from the DNA primary structure up to the architectural ensemble of DNA with histones and non-histone nuclear proteins. The role of structural proteins of nuclear matrix in maintenance supercoiled conformation of cuasicircular domains of nuclear DNA is discussed.

Key words: DNA, chromatin, supercoiled conformation, DNA domain.

*Д. Ю. Блохин***ДИНАМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ХРОМАТИНА***ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***РЕЗЮМЕ**

В обзоре литературы современные представления о структуре хроматина клеток эукариот проанализированы с точки зрения усложняющихся уровней организации ядерной ДНК — от ее первичной структуры до архитектурного ансамбля ДНК с гистоновыми и негистоновыми ядерными белками. Показана роль структурных белков ядерного матрикса в обеспечении суперспиральной конформации квазициркулярных доменов ДНК хроматина.

Ключевые слова: ДНК, хроматин, суперспиральная конформация, домены ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Полагают, что одной из основных молекулярных мишеней действия большинства высокоактивных противоопухолевых препаратов является молекула ДНК. Накоплен значительный запас сведений о химической природе подобных взаимодействий, описаны биохимические эффекты и морфологические изменения клеточных ядер, сопровождающие действие химиотерапевтических противоопухолевых средств. Морфологические изменения структуры хроматина обнаружены при воздействии на клетки не только очевидно ДНК-тропных агентов, но и соединений, точка первичного взаимодействия которых с внутриклеточными субстратами локализована вне клеточного ядра. Митотические яды (алкалоиды барвинка, колхицин), таксаны, липидоцитостатики и другие соединения, атакующие элементы цитоскелета и клеточных мембран, также вызывают структурные изменения хроматина клеток-мишеней. Логично заключить, что подобные эффекты «не-гено-тропных» соединений являются следствием одной из следующих или обеих сразу причин:

- структура хроматина консолидирована с цитоскелетом в единый комплекс;
- структура хроматина изменяется не в результате непосредственного повреждения его компонентов ксенобиотиками и их активными метаболитами, а вследствие реактивных перестроек генетического аппарата в ответ на цитотоксический стресс.

Для понимания биологических механизмов подобных клеточных реакций на действие цитотоксических веществ разных химических классов необходимы детальные представления о структуре и функциях клеточного ядра эукариотической клетки, освещению которых и посвящен настоящий обзор литературы.

**1. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ
И СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ УРОВНИ
ОРГАНИЗАЦИИ ДНК
В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ**

В третье тысячелетие человечество вступило под флагом полной расшифровки собственного генома, а 2003 г. стал для мировой научной общественности

годом полувекового юбилея открытия Джеймсом Уотсоном и Френсисом Криком двойной спирали ДНК — временем подведения итогов и оценки результатов этого эпохального для естественных наук события.

Вот что пишет в посвященном юбилею январском номере журнала Nature (2003) М. Кемп [39]: «Нет другой молекулы в истории науки, которая достигла бы иконного статуса ДНК... Двойная спираль ДНК не имеет равных в качестве символа биологических наук».

Следующая статья того же номера журнала принадлежит П. Болу [14]. Вот его оценка: *«Двойная спираль идеализирована в силу ее эстетично элегантной структуры, но не реального физического существования ДНК. Большая часть ДНК в клетке сжата в сложный клубок, который каким-то образом все-таки вовлекается в тщательный контроль регуляции генов... И не надо думать, что этот клубок может быть понят на основе идеальной двойной спирали. Эти нити представляют собой комплексы ДНК с белками — хроматин, в которых только очень короткие фрагменты нативной спирали могут временно появляться. Хотя хромосомы часто приравнивают к ДНК, не надо забывать, что в них белка в два раза больше, чем ДНК. И, кроме того, там еще содержится 10% РНК, которая синтезируется в процессе транскрипции... Создается впечатление, что геном — это открытая книга, готовая для чтения. Однако это не так. Книга закрыта, запечатана и запакована»* (цитировано по [10] в переводе автора).

В настоящем обзоре литературы прошлых лет приведены основные научные находки, позволившие сформировать современные представления о структуре и механизмах функционирования молекулы ДНК в составе хроматина эукариотической клетки.

Молекулярной основой хранения, передачи и использования генетической информации является гигантский биополимер — ДНК, функционирующий в клетках эукариот в составе хроматина, локализованного в клеточном ядре. Хроматин представляет собой сложно организованный супрамолекулярный комплекс ДНК с ядерными белками, гетерогенной ядерной РНК, липидами, гликозаминогликанами и др. Тонкая архитектура этого комплекса позволяет не только реализовать сверхкомпактную упаковку гигантской молекулы ДНК (суммарная линейная длина молекулы ДНК человека, упакованной в клеточном ядре диаметром 10–15 мкм, составляет около 2 м! [6]), но также обеспечивает упорядоченное и регулируемое функционирование генома, управляемую активацию и репрессию отдельных генов и групп генов, безошибочную репликацию всей молекулы.

В связи с главенствующей ролью ДНК в качестве носителя наследственной информации остальные компоненты хроматина можно рассматривать как важные, но все-таки вспомогательные его элементы, обеспечивающие пространственное расположение ДНК и регулирующие избирательное функционирование генов. С этой позиции структурную организацию хроматина целесообразно рассматривать в виде ряда усложняющихся уровней организации ДНК.

1.1. Первичная структура ДНК

Как любой полимер, молекула ДНК обладает первичной структурой, образованной уникальной последовательностью чередования 4 видов мономеров: азотистых оснований, 2 из которых являются пуринами, а 2 — пиримидинами, соединенными гомополимерной сахарофосфатной цепью. Фосфоэфирные связи последовательно соединяют 3'-атом углерода остатка дезоксирибозы каждого предыдущего нуклеотида с 5'-атомом углерода последующего, создавая непрерывный ковалентно-связанный остов молекулы. Последовательность азотистых оснований и является собственно генетической матрицей, на которой при помощи триплетного кода записана вся наследственная информация организма. Весьма условно можно провести аналогию между такого типа кодировкой и буквами алфавита, в определенной очередности образующих слова и фразы. Хотя в генетическом словаре всего четыре буквы, но их оказывается достаточно для шифрования последовательности 20 различных аминокислот, из которых состоят все будущие белковые молекулы — конечные продукты функционирующих генов. Таким же образом закодированы регуляторные участки генома — промоторы и энхансеры, старт- и стоп-кодоны и др.

Стабильность первичной структуры молекулы ДНК позволяет клеткам из поколения в поколение сохранять уникальную для каждого организма наследственную информацию (генотип). Изменения в последовательности чередующихся азотистых оснований (мутации) могут приводить к возникновению ошибок в наследственной информации, различные возможные последствия которых описаны ниже.

Строго говоря, первичная структура ДНК, обладая значительным консерватизмом, все же не является постоянной. Открытие мобильных диспергированных генов, транспозонов показало, что отдельные участки молекулы способны перемещаться вдоль цепи в процессе нормального функционирования и дифференцировки клеток, меняя при этом первичную структуру молекулы. Особенно такие перестройки характерны для клеток лимфоидной ткани: с ними связана терминальная дифференцировка наивных лимфоцитов, приводящая к появлению клонов узко специализированных иммунокомпетентных клеток. Неслучайность таких участков и дискретность генетической информации позволяют в ходе подобных перемещений сохранить целостность генома.

С другой стороны, некоторые вирусы (ретро-, аденовирусы и др.) способны встраивать в ДНК-клетки хозяина дополнительные элементы, а также перетаскивать участки генов или целые гены из одного локуса молекулы ДНК в другие. Действие ионизирующей радиации, химических канцерогенов и мутагенов, ошибки в процессе репликации ДНК также приводят к изменениям в первичной структуре молекулы. Такие изменения носят, как правило, случайный характер и потому изменяют целостность генома и представляют собой соматические мутации. Последствия таких изменений не однозначны.

Если мутация возникла в «бессмысленном» участке ДНК, она, как правило, носит безразличный характер. Такой же характер имеют мутации, возникающие в конститутивно репрессированных генах. Понятие конститутивной репрессии тканеспецифично и связано с особенностями клеточной дифференцировки, в связи с чем ген, репрессированный в клетках определенного типа, может оказаться функционально значимым в клетках другого гистогенеза. К примеру, герминальная (унаследованная, т. е. присутствующая во всех клетках данного организма) мутация генов *BRCA1/2* обуславливает чрезвычайно высокий риск раннего развития рака молочной железы или яичника, но никак не проявляется в клетках прочих тканей.

Если мутация затронула функционирующий ген, то ее последствия не могут носить безразличного характера, однако они и в этом случае не однозначны: при изменении последовательности оснований в регуляторных участках гена может наблюдаться как ослабление его экспрессии вплоть до полного отключения (нокаут гена), так и аномальная активация (гипер- или оверэкспрессия) вплоть до приобретения постоянной нерегулируемой активности. Наконец, мутация в «смысловой» части гена, кодирующей определенный белковый продукт (миссенс-мутация), может вызвать появление измененного белка. В свою очередь, измененный белковый продукт по функциональным свойствам может полностью соответствовать белку «дикого» типа: либо иметь сниженную специфическую активность; либо, напротив, гиперактивность; либо, наконец, приобретать иной, не свойственный белку «дикого» типа, вид активности.

Таким образом, в зависимости от совокупности многих факторов соматические мутации могут приводить как к снижению жизнеспособности клетки, остановке ее деления и гибели, так и, напротив, к ее усиленному росту и делению вплоть до опухолевой трансформации.

1.2. Вторичная структура ДНК

Вторичная структура ДНК представлена двойной спиралью, модель которой была открыта более полувека назад будущими Нобелевскими лауреатами (премия присуждена именно за это открытие) Джеймсом Уотсоном и Френсисом Криком [62]. Согласно этой модели молекула нативной ДНК представляет собой две зеркально отраженные (в отношении комплементарных друг другу пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований) антипараллельные (5'-конец одной цепи соседствует с 3'-концом другой) цепи, соединенные друг с другом силами комплементарного взаимодействия, которые обеспечиваются силами Ван-дер-Ваальса, не являются ковалентными, а потому могут быть относительно легко разрушены, что приводит к расхождению обеих нитей — денатурации молекулы ДНК. Этот процесс (локальная денатурация) абсолютно необходим для выполнения молекулой ДНК матричных функций, а также репликации самой молекулы.

В составе 2-нитевой (2-цепочечной) молекулы обе нити ДНК являются правозакрученными спиралями с общей осью: азотистые основания обращены внутрь молекулы, образуя гидрофобную зону, а обе сахарофосфатные цепи расположены периферически (плектономическая спираль). Хорошо известны несколько канонических форм двойной спирали, различающихся геометрическими размерами. Классическая В-форма, модель которой предложена Уотсоном и Криком в 1953 г., имеет следующие характеристики: один виток правозакрученной молекулы содержит 10 пар нуклеотидов, длина его проекции на ось составляет 34 Å (ангстрем), диаметр (по атомам фосфора) — 18 Å; молекула имеет большую и малую боковые бороздки с поперечником 17 и 11 Å соответственно (рис. 1). Такая форма молекулы существует в препаратах, уровень влажности которых близок к физиологическому. При частичном обезвоживании ДНК переходит в А-форму, в которой один виток содержит уже 11 пар оснований, проекция витка на ось составляет 28 Å, диаметр уменьшается на 1 Å, а ширина обеих бороздок сравнивается. С-форма, образуемая в присутствии солей лития, напротив, является более рыхлой, чем В-форма: виток содержит 9 нуклеотидных пар. Абсолютно уникальна открытая относительно недавно левозакрученная Z-форма ДНК, содержащая 12 нуклеотидов на 1 виток [55]. В пределах канонических форм возможно существование определенных промежуточных вариантов, переходы между которыми осуществляются не кооперативно, в отличие от кооперативных переходов от одной канонической формы к другой.

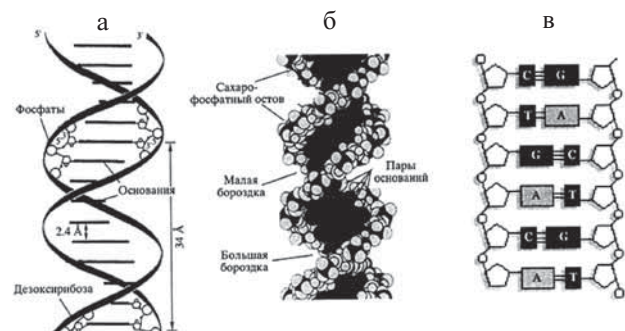


Рис. 1. Три представления двунитевой молекулы ДНК [10]:

а и б — классические изображения двуспиральной ДНК;

в — ДНК как двухцепочечная структура с неопределенными физическими параметрами, но с цепями, комплементарными друг другу;

А, С, G, Т — мономерные звенья полимерной молекулы ДНК;

С-Г, Т-А — комплементарные пары оснований, связывающие две цепи

Конформационные переходы на отдельных участках гигантской молекулы ДНК важны для высших уровней организации и функционирования хроматина и будут обсуждаться в соответствующем раз-

деле. Здесь же следует отметить, что наличие двойной спирали в любой из канонических форм возможно не только при участии 2 нитей, но и на отдельном участке 1-нитевой молекулы, однако при условии, что этот участок будет нести палиндромную последовательность, т. е. симметрично отраженную последовательность комплементарных оснований, например «...АТСАГ...СТГАТ...». В таком участке 2-нитевой молекулы ДНК может образовываться «шпилька» или «крест», представляющие собой симметричный дуплексный отросток, ось которого перпендикулярна основной оси молекулы. Обратимое образование «шпилек», как и конформационные переходы молекулы, играет определенную роль в регулировании активности отдельных генов.

1.3. Структуры ДНК высших порядков организации

В предыдущих разделах кратко описана структура собственно молекулы ДНК вне ее связи с другими компонентами хроматина. Все последующие уровни организации этого биополимера охватывают структуру супрамолекулярного комплекса ДНК.

В составе хроматина молекула ДНК находится во взаимодействии с большим количеством белков (массовое соотношение ДНК:белок в ядрах разных клеток различается, но в среднем близок к соотношению 1:1 — 1:2), которые делят на 2 неодинаковые группы гистоны и негистоновые белки хроматина. Гистоны (белки основного характера, растворимые в кислотах) составляют большую часть (до 80 %) суммарных ядерных белков, негистоновые белки (кислые, нейтральные и некоторые слабо основные) составляют количественно меньшую часть ядерных белков, но объединяют в своей группе значительно большее разнообразие структурных, ферментативных и регуляторных белковых компонентов хроматина.

Структура нуклеогистонового комплекса хорошо изучена и определяется 2 уровнями его организации: нуклеосомным и нуклеомерным [41]. Нуклеосомы представляют собой нуклеопротеидные частицы диаметром 10 нм, состоящие из центральной (коровой) белковой частицы с соленоидоподобной укладкой двунитевой молекулы ДНК на ее поверхности. Коровая частица является октамером 4 гистонов (у человека — гистоны H2a, H2b, H3 и H4), по 2 молекулы каждого на 1 частицу. Длина участка ДНК, непосредственно контактирующая с коровой частицей, составляет 140 пар нуклеотидов (п.н.), что соответствует молекулярной массе (ММ) ок. 100 кДа. ДНК, контактирующая с коровыми частицами, стерически защищена от действия эндонуклеаз. Молекула ДНК образует на поверхности коровой частицы 2 витка, после чего, не обрываясь, переходит на следующую коровую частицу. Длина свободного участка ДНК между соседними коровыми частицами (линкер) оценивается в 30–60 п.н. (10–20 нм). Морфологически нуклеосомный уровень организации хроматина выглядит, как «бусинки на нитке» (рис. 2 — заимствовано из [6]).

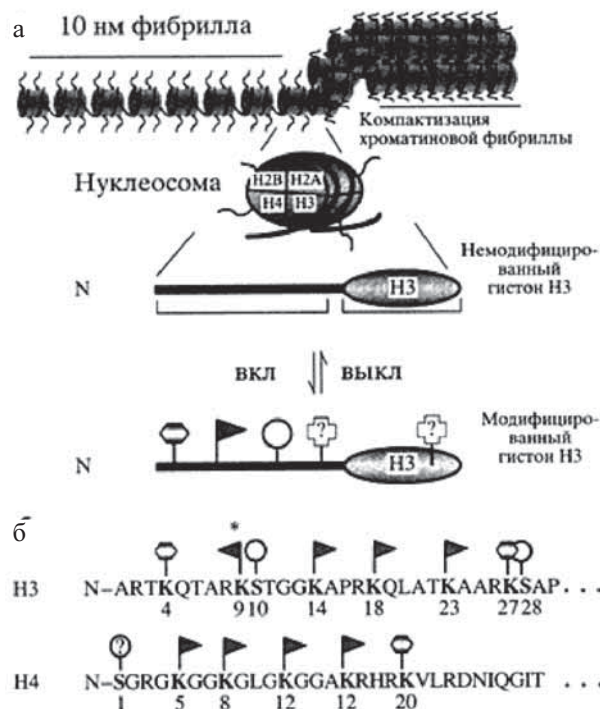


Рис.2. Схема организации хроматина и N-конца гистона H3 человека (а), возможные сайты посттрансляционных модификаций гистонов H3 и H4 (б) (заимствовано из [6]):

На поверхности нуклеосомы N-конец гистона H3, как и концы других гистонов, представлены в виде консервативного домена; на схеме гистона H3 отмечены места наиболее распространенных посттрансляционных модификаций: ацетилирование (флажок), фосфорилирование (кружок) и метилирование (шестиугольник), вполне возможны и некоторые модификации в глобулярном домене. Обращает на себя внимание пространственная регулярность мест модификаций, звездочка указывает на то, что Lys-9 может быть как ацетилирован, так и метилирован

С линкером ассоциирован гистон H1, защищающий свободный внуклеосомный участок ДНК от действия эндонуклеаз и имеющий значение для формирования следующего уровня организации хроматина — нуклеомеров [29; 59], которые являются олигомерами нуклеосом, образующими супербидную (от англ. *super beads* — большие шары) спираль. Нуклеомерная организация свойственна транскрипционно неактивному хроматину и обеспечивает его высокий уровень компактизации и защиты от нуклеазного расщепления.

В процессе репликации ДНК вся конструкция таких участков хроматина разбирается, ДНК проходит этап репликативного синтеза, после чего фактор сборки хроматина CAF-1 (**C**hromatin **a**ssembly **f**actor — **1**) доставляет к вновь синтезированной ДНК димер гистонов состава H3/H4. На следующем этапе сборки нуклеосом завершается встраиванием в них димеров H2a/H2b с участием нуклеоплазмана.

В процессе программированной клеточной гибели (апоптоза) гистон H1 расщепляется активированной каспазой-3, обнажая межнуклеосомный линкер ДНК, который немедленно атакуется активированной эндонуклеазой (каспаза- активированная ДНКаза — CAD, другое название — ДНК-фрагментирующий фактор — DFF), что приводит к гидролизу межнуклеосомных участков и распаду молекулы ДНК на фрагменты, кратные размеру нуклеосомы: моно-, ди-, три-, тетра-нуклеосомы и т.д. — которые выявляются при гелевом электрофорезе в виде дискретных зон с ММ, кратной 180-200 п.н. (характерная для апоптоза «лестница ДНК»).

Присутствие нуклеосом в промоторных участках генов препятствует образованию инициаторного комплекса транскрипции, в состав которого входят РНК-полимераза и факторы транскрипции, и для инициации транскрипции необходимо локальное разрушение нуклеосомной структуры хроматина в окрестностях промотора и регуляторных элементов. При этом конститутивно транскрибируемые гены вовсе не имеют нуклеосомной структуры в промоторной области.

Не вполне ясен механизм, посредством которого поддерживается непрерывное существование участка в виде свободной от нуклеосом последовательности ДНК: либо факторы транскрипции успевают взаимодействовать с промоторным участком еще до сборки нуклеосом, либо эти факторы связываются с соответствующими участками ДНК, содержащими нуклеосомы, и дестабилизируют последние. В пользу такого предположения свидетельствует способность коровых гистонов к многочисленным обратимым модификациям: фосфорилированию, ацетилированию, метилированию — которые вызывают конформационные изменения молекул и соответственно изменение белок-белковых взаимодействий. В частности, химическая модификация консервативных доменов гистонов H3 и H4 вызывает дестабилизацию корового октамера, который диссоциирует с освобождением 2 димеров H2a/H2b; димеры же H3/H4 сохраняют связь с ДНК, но структурно не препятствуют прохождению репликативного или транскрипционного комплексов [6].

Таким образом, обратимая сборка-разборка нуклеосом является регуляторным элементом функциональной активации генов, а хранение транскрипционно неактивного хроматина в форме супербидной спирали хромомеров предотвращает риск нуклеозного переваривания генетического материала.

Значительно менее изучены взаимоотношения ДНК с негистоновыми белками хроматина. В первую очередь, это связано с огромным количеством негистоновых белков, часть которых обладает видовой и тканевой специфичностью. По данным двухмерного электрофореза, число негистоновых белков ядра превышает 450, включая модифицированные формы [5], однако это количество учитывает только мажорные фракции, доступные визуализации при существующих методах неспецифического окрашивания электрофореграмм. С учетом минорных белковых компонентов клеточно-

го ядра реальное количество негистоновых белков хроматина может измеряться тысячами.

До сих пор отсутствует единая классификация негистоновых белков, для их классификации используют прочность их связи с хроматином (экстрагируемость), физико-химические (растворимость, изоэлектрическая точка, молекулярная масса, подвижность при электрофорезе и др.), функциональные свойства, ферментативную активность.

Часто негистоновые белки классифицируют на основании способа их выделения из препаратов тотального хроматина в растворах различной ионной силы и с содержанием разных диссоциирующих агентов. Так, до 10 % негистоновых белков может быть извлечено из хроматина экстракцией 0,35 М NaCl (глобулиновая фракция хроматина); до 90 % негистоновых белков удаляются обработкой ядер 2,0 М NaCl с 5 М мочевины или 37 %-ным раствором гуанидин-хлорида. Большая часть остаточных после такой экстракции белков может быть отделена додецилсульфатом натрия (SDS), 2-меркаптоэтанолом и щелочью. Однако и после такой обработки с ДНК остается связанной небольшое количество белка, который не удаляется даже при депротенизации ДНК фенолом или хлороформом [50]. Следовательно, взаимоотношения ДНК с разными негистоновыми белками неравнозначны, и говорить о нативной структуре супрамолекулярного комплекса хроматина можно только с позиции сохранения интактности тех или иных взаимодействий в конкретных препаратах изолированного хроматина.

В рамках настоящего обзора из всего многообразия негистоновых белков хроматина следует выделить компоненты ядерного матрикса (скелетной фибриллярно-гранулярной структуры ядра) и небольшую группу обычно сопутствующих им белков (компоненты подмембранного фиброзного слоя ядра — ламины, белки ядерных пор и некоторые другие). Именно эти компоненты клеточного ядра образуют пространственную матрицу, на которой происходит регулируемое функционирование молекулы ДНК.

Ядерный матрикс морфологически представляет собой пространственный каркас интерфазного ядра клетки, к которому определенным образом прикреплена молекула ДНК (рис. 3). Анализ сведений из литературы позволяет заключить, что выделенные препараты ядерного матрикса не соответствуют какой-либо морфо-функциональной структуре интерфазного ядра, а представляют собой остаточный продукт последовательных экстракций изолированных клеточных ядер неионными детергентами, эндонуклеазами и концентрированными солевыми растворами, т. е. устойчивую к перечисленным обработкам остаточную структуру интерфазного ядра [16]. Несоответствие термина “ядерный матрикс” строго определенному образованию связано, во-первых, с методической сложностью выделения фибриллярно-гранулярной сети в чистом виде (с достаточной интактностью ее структуры), а во-вторых, с изменчивостью самой этой сети в процессе функционирования клетки, что связано с выполнени-

ем ядерным матриксом не только механических функций пространственной организации хроматина, но и с его участием в осуществлении и регулировании генной активности. В процессе жизнедеятельности клетки ядерный матрикс, подобно цитоскелету, выполняет активную роль, что позволяет говорить о его динамичной структуре [15]. Судьба белков ядерного матрикса в митозе окончательно не выяснена: по одним данным, часть иммуногенных белков матрикса переходит в цитоплазму, по другим — состав ядерного матрикса не отличается от состава каркаса (англ. — *scaffold*) метафазных хромосом [8; 33; 54].

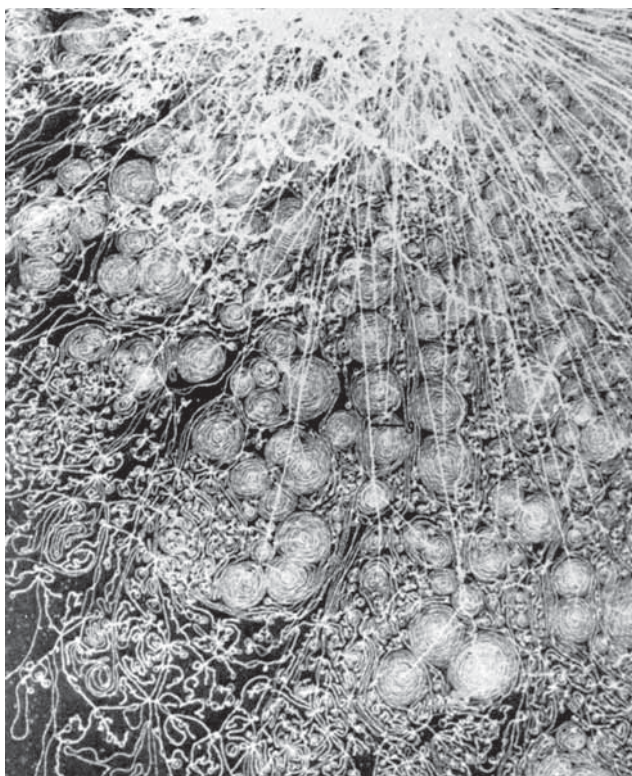


Рис. 3. Трансмиссионная электронная микрофотография препарата интерфазного хроматина [51]: хорошо различимы фибриллы ядерного матрикса и петлевые домены ДНК в конденсированном и деконденсированном состоянии

В большинстве случаев препараты ядерного матрикса при анализе одномерным электрофорезом в присутствии SDS содержат 30-40 белковых зон с ММ от 10 до 200 кДа с преобладанием 3 полос в области ММ 60–70 кДа, именуемыми «триплетом» или «ламинами», поскольку по молекулярной массе и пептидным картам они сходны с белками фиброзного слоя ядра [3; 43; 44; 57], хотя и отличаются от них иммунологически [26; 30].

В составе ядерного матрикса обнаружены сократимые белки [24; 52], что наделяет его способностью изменять объем в зависимости от концентрации бивалентных катионов [64]. С ядерным матриксом ассоциированы различные ферменты: ДНК-полимераза α ,

праймаза, поли-ADP-рибозо-полимераза (PARP), метилазы, топоизомеразы и др., рецепторы стероидных гормонов [58; 63]. Вместе с тем в препаратах ядерного матрикса обычно присутствуют компоненты ядерного фиброзного слоя и поровых комплексов, а также белки промежуточных филаментов цитоскелета [17; 18; 30; 37]. В его составе обнаруживается некоторое количество небелковых компонентов, из которых особое внимание уделяют РНК, которая обнаружена в виде как гетерогенной ядерной РНК, так и особых «малых» РНК, стабилизирующих структуру матрикса [49].

Поскольку все процедуры приготовления препаратов ядерного матрикса включают интенсивную обработку остаточных ядер эндонуклеазами, с конечным продуктом остается связанным лишь незначительное количество ДНК: до 1 % общей клеточной и около 5 % вновь синтезированной ДНК [2]. Однако интерес представляет именно эта небольшая часть остаточной ДНК, т. к. через эти ассоциированные с белком участки в нативном хроматине осуществляется прикрепление ядерной ДНК к элементам ядерного каркаса — так называемые MARs- или SARs- (от англ. — *Matrix attachment regions* / *Scaffold attachment regions*) последовательности. Роль таких элементов не ограничивается чисто механическими функциями прикрепления ДНК к ядерному матриксу. MARs/SARs, по-видимому, фланкируют отдельные гены или группы генов, контролируя их избирательную транскрипцию [35]. Синтетические плазмиды, в которых MARs/SARs-последовательности фланкируют трансфицируемый ген, транскрибируются в клетке-хозяине значительно активнее аналогичных плазмид, не несущих последовательностей связывания с ядерным матриксом [53]. Вместе с тем до сих пор не ясно, какими межмолекулярными взаимодействиями обеспечивается прикрепление MARs/SARs к элементам ядерного каркаса.

С препаратами выделенной из клеточных ядер ДНК даже после ее экстремальной депротеинизации (фенол, хлороформ / изоамиловый спирт, протеиназа К) остается связано некоторое количество негистоновых белков [11; 12]. Возможно, остаточный белок препаратов ДНК и остаточная ДНК ядерного матрикса являются компонентами одних и тех же «якорных» структур, выполняющих роль точек прикрепления и инициации репликации ДНК.

Сопоставляя структуру активно транскрибируемого хроматина со структурой его функционально не активного аналога (спермии, ядерные эритроциты птиц, рыб и амфибий), а также покоящихся и пролиферирующих клеток (ткань нормальной и регенерирующей после частичной гепатэктомии печени), можно увидеть, что ДНК прикреплена к элементам ядерного матрикса с участием 2 функционально различающихся типов взаимодействия: перманентного, присутствующего как в транскрипционно активном, так и в не активном хроматине, и транзитного, присущего функционально активируемым группам генов [9; 12; 13; 54]. Участки перманентного взаимодействия с ядерным матриксом фланкируют 5'-конец генов и содер-

жат, кроме сайта связывания с матриком, последовательности специфического узнавания транскрипционных и регуляторных факторов.

Наличие дискретных участков прикрепления ДНК к фибриллярно-гранулярному остову интерфазного ядра делит геном на функционально обособленные субъединицы — домены — участки линейной молекулы ДНК между соседними сайтами ее перманентного прикрепления к ядерному матриксу. По оценкам разных авторов, размеры доменов в разных клетках эукариот примерно совпадают и составляют 70–150 тыс. п.н., что приблизительно соответствует размеру репликона и втрое — вшестеро превышает средний размер транскриптона [20; 21; 32; 45]. В частично деконденсированном состоянии домен может морфологически выглядеть как «бусинки на нитке» (нуклеосомное строение) или как фибрилла диаметром 30 нм (супербидная спираль нуклеомеров). Дегистонизация ДНК доменов приводит к появлению петлевых структур типа «розеток», состоящих из центральной частицы диаметром 30–60 нм и отходящих от нее латерально 15–30 малых петель ДНК [11] (рис. 4). Центральная частица «розеток» разрушается при обработке полианионами или проназой, но устойчива к РНКазе. Малые петли розеток имеют размер 3–5 тыс. п.н., что соответствует содержанию ДНК в нуклеомере. Не ясно, принадлежит центральная частица «розеток» ядерному матриксу или она ассоциирована со свободными участками ДНК, но при экстракции хроматина 2,0 М NaCl не наблюдается диссоциации этих структур, если хроматин предварительно инкубировать в присутствии ионов меди.

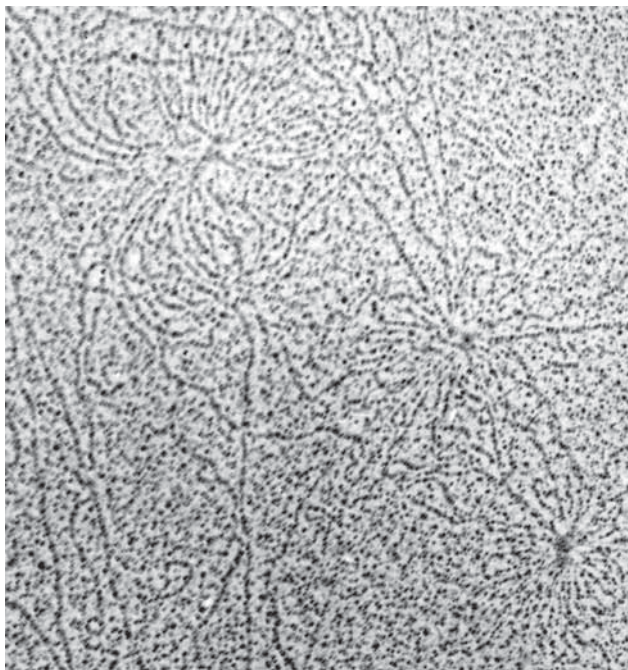


Рис. 4. Трансмиссионная электронная микрофотография препарата частично депротеинизированной ДНК из тимуса крысы [11]:

Видны «розетки», образованные петлями ДНК, прикрепленными к центральному белковым частицам. Увеличение $\times 40\,000$.

Доменно-петлевая супрамолекулярная структурная организация хроматина обеспечивает чрезвычайно компактную упаковку ДНК и одновременно дискретно-регулируемое функционирование генома [34]. Ниже будет показано, что такая организация молекулы ДНК в составе хроматина эукариотической клетки абсолютно необходима для структурного обеспечения ее особой конформации — состояния упругого осевого (торсионного) напряжения, что придает отдельным участкам молекулы (доменам) специфические физические свойства.

2. СУПЕРСПИРАЛЬНАЯ КОНФОРМАЦИЯ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК

Поскольку при написании настоящего обзора автор ориентировался на читательскую аудиторию врачей и научных сотрудников медико-биологического профиля деятельности, в предыдущей главе изложение физико-химических характеристик двойной спирали ДНК сведено к необходимому минимуму. Однако в настоящей главе описание следующего уровня супрамолекулярной организации ДНК без самых минимальных математических расчетов невозможно. Извинением автора перед читателями может служить фраза Альберта Эйнштейна: «Мы стараемся изложить материал так просто, как это только возможно. Но не проще этого».

Интактная ДНК, находящаяся в физиологических условиях вне транскрипционного или репликативного синтеза, в подавляющем большинстве случаев является двунитевой молекулой, причем обе нити биополимера закручены антипараллельно вокруг общей оси, т. е. как бы обвивают друг друга. Иными словами, обе нити сцеплены между собой и не могут быть разделены без раскручивания. Топологической характеристикой (топология — математическое описание пространственного расположения геометрических тел) подобной структуры является *порядок зацепления* или *топологическое число сцеплений*, обозначаемый символом Lk (от англ. *linking* — зацепление). Наглядно значение Lk легко представить, мысленно расправив 1 из 2 нитей на плоскости. Тогда 2-я нить, обвиваясь вокруг 1-й, несколько раз пересечет эту плоскость («проткнет» ее насквозь). Число таких сквозных «проколов» и составляет значение числа топологических сцеплений 2 нитей.

Легко видеть, что для линейной молекулы ДНК число сцеплений равно числу дуплексных витков, т. е.

$$Lk = N / P, \quad (1)$$

где N — длина молекулы, выраженная в количестве нуклеотидных пар;

P — шаг двойной спирали, выраженный в числе нуклеотидных пар, приходящихся на 1 виток.

Понятно, что шаг определяется канонической формой молекулы ДНК. Если в результате изменения внешних условий молекула переходит в другую каноническую форму, то шаг двойной спирали изменяется, а с ним пропорционально изменяется топологическое число сцеплений нитей. Это происходит благодаря тому, что

концы дуплекса не закреплены относительно друг друга и могут свободно вращаться вокруг общей оси.

Принципиально иная ситуация возникает при замыкании обеих нитей в кольцо. Важнейшим свойством кольцевых молекул ДНК является *топологическая инвариантность числа сцеплений*, т. е. невозможность изменения числа сцеплений никакими деформациями молекулы, если сохраняется непрерывность сахаро-фосфатных цепей на всем их протяжении. Таким образом, кольцевым замкнутым ДНК изначально (в момент лигазного замыкания нитей в кольцо) «навязано» некое число сцеплений, причем это число выражается целочисленными значениями. Изменение шага двойной спирали в условиях инвариантности числа сцеплений приводит к возникновению *супервитков*, т. е. витков, которые образует в пространстве сама ось дуплекса. Количество супервитков τ определяется соотношением:

$$\tau = Lk - N / P. \quad (2)$$

Число супервитков, отнесенное к длине дуплекса (числу дуплексных витков двойной спирали), называют плотностью суперспирализации σ :

$$\sigma = \tau \times P / N = (Lk \times P / N) - 1. \quad (3)$$

Из уравнения (2) следует, что величина τ может иметь как положительное (включая нулевое), так и отрицательное значение. Для всех нативных кольцевых молекул ДНК вирусов и плазмид характерна отрицательная суперспирализация, при которой топологическое число сцеплений меньше дуплексного числа витков.

Наличие супервитков приводит молекулу в состояние упругого осевого напряжения, поскольку энергетически выгодным является так называемое релаксированное состояние, т. е. состояние равенства числа сцеплений дуплексному числу витков. Единственный 1-нитевой разрыв сахаро-фосфатной цепи кольцевой замкнутой молекулы ДНК создает точку свободного вращения одной нити относительно другой, что приводит к сбрасыванию избыточной свободной энергии супервитков и изменению числа сцеплений молекулы.

Возможность запастись свободную энергию в виде упругой торсионной энергии супервитков во многом определяет особые свойства суперспиральной ДНК и те биологические эффекты, которые связаны с ее суперспиральной конформацией. В частности, суперспирализация приводит к ослаблению дуплексных комплементарных взаимодействий обеих нитей (вторичная структура — см. 1.2.), что обуславливает более легкое их разделение — локальную денатурацию, плавление. С этим связана большая транскрипционная активность суперспиральных плазмид при трансфекции в сравнении с их релаксированными формами [42; 46; 47; 56], а также предпочтительное накопление интеркалирующих агентов в суперспирализованных участках молекулы [23; 31].

В то же время интеркаляция отдельных лигандов в дуплекс несколько изменяет взаиморасположение нуклеотидных пар, что меняет шаг двойной спирали [61]. Например, связывание фенантридинового краси-

теля бромистого этидия с ДНК уменьшает осевое кручение последней на 26° на каждую молекулу связанного лиганда [38], т. е. увеличивает шаг спирали P и соответственно уменьшает величину соотношения N/P . В условиях кольцевой замкнутой ДНК, для которой значения Lk и N — величины постоянные, это приводит к изменению числа супервитков. В соответствии с уравнением (2) по мере накопления интеркалятора в гидрофобной области молекулы ДНК сначала снижается плотность отрицательной суперспирализации, молекула переходит в релаксированное состояние, а затем, при повышении концентрации интеркалятора, образуются положительные супервитки — молекула принимает оппозитную конформацию.

Подобное изменение суперспиральной плотности замкнутых кольцевых ДНК происходит при их переходе от одной канонической формы двойной спирали к другой (даже на ограниченном участке молекулы): изменение (среднего) шага дуплекса при инвариантности числа сцеплений изменяет число супервитков τ .

Явление суперспирализации кольцевых замкнутых ДНК открыл в 60-х гг. прошлого века Джером Виноград [60], а математическую разработку этого явления выполнил Брок Фуллер [27], который обосновал связь числа сцеплений молекулы с 2 топологическими характеристиками: Tw (от англ. *twisting* — кручение) и некоторого параметра, описывающего изгибы оси молекулы в пространстве. Последний назван Wr (от англ. *writhe* — скрючиваться, корчиться). Соотношение имеет вид:

$$Lk = Tw + Wr. \quad (4)$$

Уравнение (4) обосновывает существование супервитков молекулы ДНК в различных геометрических конфигурациях.

3. СУПЕРСПИРАЛЬНАЯ ДНК КЛЕТОЧНОГО ЯДРА ЭУКАРИОТ

Все описанное в предыдущем разделе относится к суперспирализации кольцевых замкнутых ДНК вирусов и плазмид. Однако ДНК эукариот является линейным полимером, для которого число сцеплений нитей не является инвариантным, и, следовательно, суперспирализация его невозможна. Это соответствует действительности, если вести речь об изолированных из состава хроматина препаратах ДНК: таким тщательно депротенизированным молекулам не свойственна суперспиральная конформация, поскольку нити, составляющие дуплекс, не замкнуты и имеют точки свободного вращения. Однако в составе хроматина молекула ДНК имеет участки прикрепления к жесткой пространственной сетке ядерного матрикса, причем связи эти таковы, что наделяют отдельные петлевые домены — участки линейной молекулы между 2 соседними сайтами перманентного прикрепления к ядерному матриксу — свойствами кольцевых замкнутых молекул: в точках прикрепления обе нити фиксированы, что исключает их взаимное раскручивание. Поскольку истинно замкнутых молекул такие домены не образуют, их именуют квазизамкнутыми (квазицир-

кулярными). Другими словами, кроме уже упоминавшихся в разделе 1.3. функций пространственной ориентации отдельных участков молекулы ДНК и фланкирования сайтов инициации транскрипции и репликации, ядерный матрикс выполняет роль конформационных ограничений отдельных петлевых доменов и их совокупности, т. е. всего генома в целом.

Явление суперспирализации ДНК эукариот предсказал в начале 70-х гг. прошлого столетия П. Кук [19]. Вскоре гипотеза блестяще подтвердилась работами самого Кука и ряда других исследователей [20–23; 48; 51]: суперспиральная ДНК была препаративно выделена из ряда объектов в условиях, исключающих ферментативную и гидродинамическую деградацию материала. Более того, если процедуру выделения препаратов ядерного матрикса изменить таким образом, чтобы исключить действие эндонуклеаз (в том числе — эндогенных) и минимизировать влияние гидродинамического сдвига, из клеток можно выделить препараты остаточных ядер, сохраняющие их форму, некоторые черты морфологии и содержащие всю ядерную ДНК в виде суперспирализованных доменов [21; 48; 51]. Такие препараты получили наименование *нуклеоиды* — ядроподобные [21]. Нуклеоиды, выделенные из разных клеток эукариот, широко использовались в качестве изучаемых объектов в дальнейших исследованиях структуры интерфазного хроматина. Подобно кольцевым замкнутым ДНК вирусам и плазмид, нуклеоиды эукариот во всех случаях содержат отрицательно суперспирализованную ДНК, которая легко поддается эластовискозиметрическому титрованию бромистым этидием [1].

Обычно нуклеоиды получают, лизируя целые клетки нейтральными концентрированными растворами хлористого натрия (1–2 М NaCl) в присутствии неионных детергентов (NP40, Тритон X-100) и высоких концентраций EDTA. Часто применяют ингибиторы протеолитических ферментов и РНКаз. Столь интенсивная обработка позволяет усомниться в реальности существования суперспиральной конформации ДНК в живой клетке. Действительно, значительное изменение ионной силы окружения, экстракция белков могут приводить к конформационным переходам молекулы ДНК, а дегистонизация хроматина прямо приводит к образованию артефактных супервитков — по 2 на каждую диссоциировавшую нуклеосому.

Однако именно суперспиральной конформацией отдельных доменов ДНК, на наш взгляд, объясняется известный факт значительно более низких температур плавления ДНК в составе хроматина по сравнению с плавлением очищенных препаратов ДНК. Существование обратимой суперспирализации ДНК в эукариотической клетке подтверждается также фактом существования особого класса ферментов — топоизомераз — и их жизненной необходимостью для функционирования любого эукариотического организма. Ингибиторы топоизомераз являются сильнейшими клеточными ядами, ряд из которых давно и успешно используется в онкологической практике [36].

Единственным биологическим назначением топоизомераз является образование топологических изомеров ДНК, для чего топоизомеразы обладают эндонуклеазной и лигазной активностями. По механизму осуществления своей активности топоизомеразы эукариот подразделяют на 2 типа. Топоизомераза I (релаксирующий фактор, надрезающе-сшивающий фермент) способна гидролизовать фосфо-эфирную связь сахаро-фосфатной цепи молекулы ДНК с одновременным ковалентным присоединением фермента к 3'-концу образовавшегося разрыва за счет энергии разорванной связи. Такая структура, содержащая белок-ассоциированный одонитевый разрыв ДНК, является интермедиатом топоизомеразной реакции I типа. На стадии этого интермедиата происходит дозированное или полное сбрасывание супервитков через шарнирную точку вращения, образованную 1-нитевым разрывом ДНК. По достижении термодинамически выгодного состояния выполняется лигазный этап реакции, при котором молекула ДНК в месте разрыва сшивается за счет энергии гидролизуемой связи ДНК-белок. Таким образом, процесс не требует затрат энергии АТФ (топоизомеразы I не обладают АТФ-азной активностью) и обеспечивается исключительно торсионной энергией супервитков. При наличии супервитков с участием топоизомеразы I происходит их удаление независимо от знака суперспирали, а в присутствии полного набора коровых гистонов и нуклеоплазмина происходит сборка нуклеосом, которая невозможна без топоизомеразы вследствие возникновения топологических напряжений молекулы ДНК при ее «наматывании» на коровые частицы [40]. Таким образом, снятие возникающих напряжений под действием топоизомеразы изменяет число сцеплений квазизамкнутого домена ДНК на любое целочисленное значение, что сдвигает термодинамическое равновесие в сторону образования нуклеогистонового комплекса; последующее удаление гистонов без разрыва хотя бы 1-й нити ДНК генерирует супервитки.

В отличие от описанного фермента, топоизомераза II обладает собственной АТФ-азной активностью и способна генерировать супервитки ДНК за счет энергии АТФ: фермент связывается сразу с обеими нитями дуплекса, производя, подобно топоизомеразе I, белок-ассоциированные разрывы молекулы ДНК, но разрывает одновременно обе нити в сайтах, смещенных относительно друг друга на 4 нуклеотида. Так формируется интермедиат топоизомеразной реакции II типа: белок-ассоциированный косой 2-нитевой разрыв с наличием «липких концов». Сквозь этот разрыв может быть пропущен соседний локус молекулы ДНК, после чего разрыв воссоединяется, а связь фермента с молекулой ДНК гидролизуется. Если реакция протекает без участия АТФ, то ее результатом, подобно топоизомеразе I, является только релаксация молекулы за счет свободной энергии супервитков. Если же затрачивается энергия АТФ, то результатом топоизомеразной реакции II типа будет генерирование дополнительных супервитков за счет энергозависимого изменения кон-

формации фермента. В любом случае топологическое число сцеплений молекулы ДНК изменяется на величину, кратную 2.

Таким образом, в клетке эукариот функционирует ферментативный механизм активного регулирования суперспиральной конформации ДНК. Аналогичный процесс в прокариотических клетках бактерий обслуживается топоизомеразной активностью гираз, специфические ингибиторы которых (налидиксовая кислота, фторхинолоны — оксофлоксацин, пефлоксацин) являются мощными антибактериальными лекарствами широкого спектра действия. Очевидно, посредством механизма регулируемой суперспирализации ДНК в пределах отдельных доменов обеспечивается управление процессами транскрипции и репликации — важнейшими функциями генетического аппарата [25; 40; 56; 65]. Подавление активности топоизомераз ингибиторами этого фермента (эпиподофиллотоксины — этопозид, тенипозид; антрациклиновые антибиотики; митоксантрон; m-AMSA; камптотecin, бисбензimid и др.) сопровождается остановкой пролиферации клетки и угнетением транскрипционной активности хроматина. Те же последствия вызывает ионизирующее излучение, индуцирующее появление однонитевых разрывов в молекуле ДНК: 2-спиральный домен ДНК, имеющий хотя бы один 1-нитевой разрыв, перестает быть квазициркулярным, его избыточная энергия суперспирализации сбрасывается через образовавшуюся шарнирную точку вращения, в результате чего затрудняется локальная денатурация и инициация транскрипции и репликации.

Как уже упоминалось выше, управление плотностью суперспирализации доменов ДНК хроматина может осуществляться по крайней мере 3 регулирующими механизмами: обратимое образование и конденсация нуклеосом; локальные конформационные переходы в доменах ДНК, особенно В-Z-переходы [28]; изменение суперспиральной плотности при образовании «шпилек» и крестообразных структур в палиндромных последовательностях. Однако минимально необходимым условием существования суперспиральной конформации ДНК является квазизамкнутость ее структурных доменов. Это положение является принципиальным для использования структурной дискретности генома с целью избирательного регулирования его функций.

4. СИСТЕМНАЯ РЕАКЦИЯ КЛЕТКИ НА ЛОКАЛЬНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА

Первичными мишенями многих противоопухолевых цитотоксических соединений являются собственно молекула ДНК или ферменты, обслуживающие процессы транскрипции и репликации.

Химическая модификация азотистых оснований ДНК (алкилирующие агенты, комплексные соединения металлов) влечет за собой активацию эксцизионной репарации, в ходе которой производится эндонуклеазный разрыв нити ДНК на некотором удалении от сайта повреждения, дальнейшее экзонуклеазное рас-

ширение бреши с выщеплением поврежденного основания, и последующий внеплановый синтез репарируемой нити ДНК для заполнения образованного на первом этапе однонитевого участка молекулы вновь синтезированным фрагментом. Таким образом, формирование разрыва нити ДНК при алкилировании оснований является активным процессом клеточного ответа, направленным на устранение повреждения, но протекающим с временным образованием еще большего повреждения.

Если химической модификации подверглись сразу два основания, локализованные в разных нитях ДНК, но в непосредственной близости друг от друга (достаточно вероятное событие при действии бифункциональных алкилирующих агентов), то эксцизионные бреши, формируемые репаративной системой в обеих нитях, могут перекрываться, что приводит к возникновению двунитевого разрыва молекулы ДНК — намного более драматичному повреждению, часто не поддающемуся дальнейшей репарации.

Не поддающееся репарации повреждение ДНК грозит наследственным закреплением возникшей мутации, если клетка продолжит репликативный цикл. Периодический контроль за состоянием собственного генома осуществляется в так называемых сверочных точках (англ. *check-points*) клеточного цикла. Известны по крайней мере 4 сверочные точки, в которых происходит анализ правильной последовательности событий репликативного цикла. 3 из них (при переходе из фазы G₁ в фазу S; собственно в S-фазе; при переходе G₂ в M) связаны с контролем отсутствия повреждений в молекуле ДНК (G₁-S и S), адекватности (S) и полноты (G₂-M) ее репликации. 4-я предназначена для проверки ахроматинового веретена деления (*Spindle-assembly check-point*, метафаза митоза). Именно в этих точках может быть осуществлен обратимый или необратимый арест пролиферации — типичный результат применения цитостатических и цитотоксических химических соединений, предшествующий активации программы клеточной гибели.

Ключевым компонентом первых 3 точек является белковый продукт гена *TP53* (прежнее название — *P53*) — сравнительно коротко живущий белок, способный к многочисленным посттрансляционным модификациям (имеет несколько сайтов фосфорилирования и ацетилирования, модификация которых регулирует его полифункциональность), который часто образно именуют «стражем генома». Например, активируясь при возникновении повреждений ДНК в фазе G₁ вследствие фосфорилирования специфическими киназами ATM и CHK1/2, белок p53 трансактивирует респонсивные (регулируемые им) гены, в частности, сигнальных белков p21^{WAF1} и GADD45 (от англ. *Growth Arrest and DNA Damage-induced*), компонентов сигнальных путей апоптоза (CD95/Fas/Apo-1, FasL, TRAIL, Bax, Bcl-X, 14-3-3, PUMA и др.) и белка Mdm2, контролирующего активность самого p53. Активация сигнального пути p53-p21^{WAF1}-pRb вызывает остановку клеточного цикла в сверочной точке G₁-S [7].

Арест клеточной пролиферации в сверхочной точке сопровождается попыткой репарации обнаруженного повреждения молекулы ДНК. Если эта попытка оказалась удачной и корректную структуру ДНК удалось восстановить, арест отменяется, и клетка продолжает цикл деления. Если дефект не ликвидирован, вследствие накопления «стрессовой» формы фосфорилированного и ацетилованного белка p53 происходит либо необратимый арест пролиферации, либо активируется программа апоптоза — последовательного саморазрушения клетки.

На молекулярном уровне отмена ареста пролиферации связана с протеасомной деградацией активированного белка p53 после его убиквитинирования белком Mdm2, выполняющим роль специфической убиквитин-протеинлигазы (фермента E3) белка p53. Процесс убиквитинирования белков, подлежащих последующей деградации в протеасомах — специфических органеллах клетки, является универсальным механизмом ликвидации поврежденных или ставших ненужными белковых молекул, в которых малый белок убиквитин играет роль «печати смерти» для обреченной молекулы.

Молекулярный механизм активации программы апоптоза при наличии не репарированных поврежденных ДНК до сих пор не ясен, но именно индукция апоптоза опухолевых клеток лежит в основе цитотоксического действия специфической противоопухолевой радио- и химиотерапии онкологических заболеваний, а репрессия программы смерти ведет к развитию множественной лекарственной устойчивости клеток злокачественных опухолей [4]. Таким образом, ДНК-тропные лекарственные препараты и ингибиторы топоизомераз проявляют цитотоксическую активность, используя программу генетического самоконтроля клеток-мишеней. Активация программы клеточной гибели при воздействии «не-генотропных» лекарственных препаратов происходит по иным молекулярным механизмам.

Хотя описанный процесс генетического самоконтроля активно эксплуатируется клетками для репарации вызванных лекарственной терапией генетических повреждений, эволюционно он возник задолго до появления химиотерапии и предназначен для ликвидации возникающих соматических мутаций. Некоторые мутации гена *TP53* приводят к синтезу дефектного белкового продукта, не способного к выполнению своих функций, либо к полной остановке его синтеза. Последствия таких мутаций — дестабилизация генома вследствие накопления и клонального закрепления соматических мутаций, в связи с чем принято говорить о «мутаторном» (склонном к накоплению мутаций) фенотипе таких клеток [7]. Инактивирующие мутации гена *TP53* нередко сопровождают опухолевый рост: около половины всех клинически наблюдаемых злокачественных опухолей человека ассоциированы с такими мутациями.

Однако система контроля за состоянием собственного генома по-видимому не ограничивается функцией белка p53. Действительно, половина исследован-

ных опухолей человека несет инактивирующие мутации гена *TP53*, но их клетки реагируют на применение цитотоксических соединений по той же схеме: остановка клеточного цикла в одной из его сверхочных точек (причем в различных при применении цитотоксинов разного механизма действия), попытка репарации повреждений, активация программы клеточной гибели. Следовательно, должна существовать дополнительная (или дублирующая?) система генетического контроля. Недавно обнаружены два гена, белковые продукты которых обладают значительной степенью гомологии с белком p53. Это сходство отражено в названии новых генов — *p63* и *p73*. Гомология структуры сопровождается некоторым подобием функций этих белков: белки p63 и p73 способны активировать некоторые (но не все) из p53-респонсивных генов [7]. Однако, в отличие от повсеместно экспрессируемого гена *TP53*, гены *p63* и *p73* экспрессированы в клетках лишь некоторых тканей взрослых и в эмбриональных тканях, в связи с чем не могут конститутивно выполнять функцию «стражей генома».

Сегодня окончательно не установлено, каким образом клетка воспринимает информацию как о наличии повреждений ДНК, так и о полноте ее восстановления в процессе репарации, однако не последнюю роль в таком распознавании играет суперспиральная конформация петлевых доменов — состояние упругого осевого напряжения, необходимое для инициации транскрипции и репликации. При наличии нитевых разрывов молекулы такое состояние становится невозможным вследствие наличия точки вращения одной нити молекулы вокруг другой. Релаксация домена вызывает блокирование инициации ДНК- и РНК-полимеразной реакции. Таким образом, пространственная архитектура хроматина является одним из регуляторных факторов управляемого функционирования клеточного генома.

Резюмируя изложение, следует выделить основные моменты:

- в составе хроматина эукариотических клеток ДНК организована в систему дискретных петель-доменов, перманентно прикрепленных к элементам ядерного каркаса;
- точки перманентного прикрепления ДНК к ядерному матриксу локализованы в сайтах, фланкирующих 5'-концевые участки генов или групп генов, содержат сайты связывания с регуляторными факторами транскрипции;
- природа связи ДНК с ядерным матриксом такова, что отдельные петлевые домены являются структурными аналогами кольцевых замкнутых молекул ДНК вирусов и плазмид, т. е. домены ДНК имеют конформационные ограничения, обеспечивающие их квазициркулярную структуру;
- транскрипционная активация и репрессия отдельных генов и/или групп генов осуществляется дискретно, путем контролируемых конформационных изменений супрамолекулярного комплекса в пределах отдельных доменов ДНК.

Автор посвящает настоящую статью памяти своего учителя, коллеги и друга Виктора Александровича Стручкова.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Блохин Д.Ю., Стручков В.А.* Капиллярная эластовискозиметрия нуклеоидов эукариот // Биополимеры и клетка. — 1988. — Т. 4, № 4. — С. 203–211.
2. *Блохин Д.Ю., Стручков В.А.* Белковый состав ядерного матрикса изменяется под влиянием липазы // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 6. — С. 73–77.
3. *Блохин Д.Ю., Стручков В.А.* Белковый состав ядерного матрикса в клетках различных тканей животных // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 1. — С. 41–45.
4. *Блохин Д.Ю.* Фенотип множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, обусловленный нарушением программы клеточной гибели // Вестн. РАМН. — 2004. — № 12. — С. 16–20.
5. *Караванов А.А., Афанасьев В.Н.* Негистоновые белки хроматина // Мол. Биол. — 1983. — Т. 17, № 2. — С. 213–233.
6. *Карпов В.Л.* ДНК, хроматин, гистоновый код // Вестник РАН. — 2003. — Т. 73, № 6. — С. 506–513.
7. *Копнин Б.П.* Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. — В кн.: «Канцерогенез» / Под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 125–158.
8. *Наседкина Т.В., Слезингер С.И.* Изменения в структуре нуклеогистоновых фибрилл хромосомы при удалении бивалентных катионов и гистона H1 // Цитология. — 1983. — Т. 25, № 9. — С. 1054–1058.
9. *Разин С.В., Чернохвостов В.В., Рудин А.В. и др.* Белки, особо прочно связанные с ДНК в участках ее прикрепления к матриксу интерфазного ядра // Докл. АН СССР. — 1982. — Т. 263, № 4. — С. 1019–1021.
10. *Свердлов Е.Д.* ДНК в клетке: от молекулярной иконы к проблеме "что есть жизнь?" // Вестник РАН. — 2003. — Т. 73, № 6. — С. 497–505.
11. *Стручков В.А., Стражевская Н.Б., Блохин Д.Ю.* Роль дисульфидных мостиков остаточного белка в организации хромосомальной ДНК // Биофизика. — 1995. — Т. 40, № 2. — С. 296–316.
12. *Сьякте Н.И., Блохин Д.Ю.* Белковый состав комплексов ДНК-матрикс с "прочным" и "слабым" типом связи, выделенных из клеток асцитной карциномы Эрлиха // Биохимия. — 1989. — Т. 54, № 7. — С. 1217–1223.
13. *Яровая О.В., Разин С.В.* Два типа участков прикрепления ДНК к ядерному скелету в клетках асцитной карциномы Эрлиха // Мол. Биол. — 1983. — Т. 17, № 2. — С. 303–313.
14. *Ball P.* Portrait of a molecule // Nature. — 2003. — Vol. 421. — P. 421–422.
15. *Berezney R.* Dynamic properties of the nuclear matrix // "The cell nucleus" / H. Busch ed., NY: Acad. Press., 1979. — 7. — P. 413–456.
16. *Berezney R., Buchholtz L.A.* Isolation and characterization of rat liver nuclear matrices containing rat liver high molecular weight DNA // Biochemistry. — 1981. — Vol. 20, № 17. — P. 4995–5002.
17. *Berezney R., Coffey D.S.* Identification of a nuclear protein matrix // Biochem. Biophys. Res. Comms. — 1974. — Vol. 60. — P. 1410–1417.
18. *Boulikas T., Hancock R.* The laminae protein is in ultimate contact with the DNA in nuclear skeletons // Biol. Cell. — 1982. — Vol. 45, № 2. — Sp. Iss. — P. 106.
19. *Cook P.R.* Hypothesis of differentiation and the inheritance of gene superstructure // Nature. — 1973. — Vol. 245. — P. 23–25.
20. *Cook P.R., Brazell I.A.* Supercoils in human DNA // J. Cell Sci. — 1975. — Vol. 19, № 2. — P. 261–279.
21. *Cook P.R., Brazell I.A.* Conformational constraints in nuclear DNA // J. Cell. Sci. — 1976. — Vol. 22, № 2. — P. 287–302.
22. *Cook P.R., Brazell I.A., Jost E.* Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA // J. Cell Sci. — 1976. — Vol. 22, № 2. — P. 303–324.
23. *Cook P.R., Brazell I.A.* Spectrofluorometric measurements of the binding of ethidium to superhelical DNA // Eur. J. Biochem. — 1978. — Vol. 84, № 2. — P. 465–477.
24. *Douvas A.S., Harrington C.A., Bonner J.* Major non-histone proteins of rat chromatin: preliminary identification of myosin, actin and tropomyosin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1975. — Vol. 72, № 10. — P. 3902–3906.
25. *Droge P.* Protein-induced supercoiling of DNA: a tool to regulate DNA transactions in vivo? // BioEssays. — 1993. — Vol. 16. — P. 91–99.
26. *Fields A.P., Kaufman S.H., Shaper J.H.* Isolation, chemical characterization and immune-localization of an acidic non-histone protein to the nucleolus of rat liver nuclei // 8-th Int. Nucle(ol)ar Workshop, Banyuls, 1983. — P. 30.
27. *Fuller F.B.* Decomposition of the linking number of a closed ribbon: a problem from molecular biology // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75, № 8. — P. 3557–3561.
28. *Gagna C.E., Lambert W.C., Kuo H.-R., Farnsworth P.N.* Localization of B-DNA and Z-DNA in terminally differentiating fiber cells in adult lens // J. Histochem. Cytochem. — 1997. — Vol. 45, № 11. — P. 1511–1521.
29. *Georgiev G.P., Nedospasov S.A., Bakaev V.V.* Supranucleosomal levels of chromatin organization. — "The cell nucleus" / H. Busch ed., NY: Acad. Press, 1978. — P. 3–34.
30. *Gerace L., Blum A., Blobel G.* Immunochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fractions. Interphase and mitotic distribution // J. Cell Biol. — 1978. — Vol. 79, № 2. — P. 546–566.
31. *Gruzdev A.D., Shurdov M.A.* Topological state of DNA in polytene chromosomes // Biochim. Biophys. Acta. — 1992. — Vol. 1131. — P. 35–40.
32. *Hartwig M.* The size of independently supercoiled domains in nuclear DNA from normal human and leukemic lymphoblasts // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — Vol. 698, № 2. — P. 214–217.
33. *Honge L.D., Mancini P., Davis F.M., Heywood P.* Nuclear matrix of HeLa S3 cells. Polypeptide composition

- during adenovirus infection and in phases of the cell cycle // *J. Cell Biol.* — 1977. — Vol. 72, № 1. — P. 194–208.
34. Igo-Kemenes T., Horz W., Zachau H.G. Chromatin // *Ann. Rev. Biochem.* — 1982. — Vol. 51. — P. 89–121.
35. Jupe E.R., Sinden R.R., Cartwright I.L. Specialized chromatin structure domain boundary elements flanking a *Drosophila* heat shock gene locus are under torsional strain in vivo // *Biochemistry.* — 1995. — Vol. 34. — P. 2628–2633.
36. Kaufmann S.H. Induction of endonucleolytic DNA cleaved in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note // *Cancer Res.* — 1989. — Vol. 49. — P. 5870–5878.
37. Kaufmann S.H., Coffey D.S., Shaper J.H. Considerations on the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex-lamina // *Exp. Cell Res.* — 1981. — Vol. 132, № 1. — P. 105–123.
38. Keller W. Determination of the number of superhelical turns in simian virus 40 DNA by gel electrophoresis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1975. — Vol. 72, № 12. — P. 4876–4880.
39. Kemp M. The Mona Lisa of modern science // *Nature.* — 2003. — Vol. 421. — P. 419–420.
40. Kimura K., Hirano T. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin; a biochemical implication for chromosome condensation // *Cell.* — 1997. — Vol. 90. — P. 625–634.
41. Kornberg R.D. Structure of chromatin // *Ann. Rev. Biochem.* — 1977. — Vol. 46. — P. 931–954.
42. Kramer P.R., Sinden R.R. Measurement of unrestrained negative supercoiling and topological domain size in living human cells // *Biochemistry.* — 1997. — Vol. 18. — P. 3151–3158.
43. Krohne G., Franke W.W., Scheer U. The major polypeptides of the nuclear pore complex // *Exp. Cell Res.* — 1978. — Vol. 116, № 1. — P. 85–102.
44. Kuzmina S., Buldayeva T., Troitskaya L., Zbarsky I. Characterization and fractionation of rat liver nuclear matrix // *Eur. J. Cell Biol.* — 1981. — Vol. 25, № 2. — P. 225–232.
45. Lima-de-Faria A. The relation between chromomeres, replicons, operons, transcription units, genes virus and palindromes // *Hereditas.* — 1975. — Vol. 81. — P. 249–284.
46. Liu L.F., Wang J.C. Supercoiling of the DNA template during transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1987. — Vol. 84. — P. 1353–1358.
47. Ljungman M., Hanawalt P.C. Presence of negative torsional tension in the promoter region of the transcriptionally poised DHFR gene in vivo // *Nucl. Acids Res.* — 1995. — Vol. 23. — P. 1782–1789.
48. McCready S.J., Akrigg A., Cook P.R. Electron-microscopy of intact nuclear DNA from human cells // *J. Cell Sci.* — 1979. — Vol. 39, № 1. — P. 53–62.
49. Miller T.E., Huang C.Y., Pogo A.O. Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing hnRNA // *J. Cell Biol.* — 1978. — Vol. 76, № 4. — P. 675–691.
50. Muller M., Spiess E., Werner D. Fragmentation of “nuclear matrix” on a mica target // *Eur. J. Cell Biol.* — 1983. — Vol. 31. — P. 158–166.
51. Mullinger A.M., Johnson R.T. The organization of supercoiled DNA from human chromosomes // *J. Cell Sci.* — 1979. — Vol. 38. — P. 369–389.
52. Nakayasu H., Ueda K. Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes // *Exp. Cell Res.* — 1983. — Vol. 143, № 1. — P. 55–62.
53. Nowak W., Gawłowska M., Jarmolowski A., Augustyniak J. Effect of nuclear matrix attachment regions on transgene expression in tobacco plants // *Acta Biochim. Polonica.* — 2001. — Vol. 4, № 3. — P. 637–646.
54. Razin S.V., Chernokhvostov V.V., Roodin A.V. et al. Proteins tightly bound to DNA in the regions of DNA attachment to the skeletal structures of interphase nuclei and metaphase chromosomes // *Cell.* — 1981. — Vol. 27, № 1. — P. 65–74.
55. Rich A., Nordheim A., Wang A.H.-J. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA // *Ann. Rev. Biochem.* — 1984. — Vol. 53. — P. 791–846.
56. Sekiguchi J.M., Swank R.A., Kmiek E.B. Changes in DNA topology can modulate in vitro transcription of certain RNAP III genes // *Mol. Cell. Biochem.* — 1989. — Vol. 85. — P. 123–133.
57. Shelton K.R., Guthrie V.N., Cochran D.L. On the variation of the major nuclear envelope (lamina) polypeptides // *Biochem. Biophys. Res. Comms.* — 1980. — Vol. 93, № 3. — P. 867–872.
58. Smith H., Berezney R. DNA-polymerase- δ is tightly bound to the nuclear matrix of actively replicating liver // *Biochem. Biophys. Res. Comms.* — 1980. — Vol. 97, № 4. — P. 1541–1547.
59. Tatchell K., Van Holde K.E. Compact oligomers and nucleosome phasing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1978. — Vol. 75, № 8. — P. 3583–3587.
60. Vinograd J., Lebovitz J., Watson R. Early and late helix-coil transition in closed circular DNA. The number of superhelical turns in polyoma DNA // *J. Mol. Biol.* — 1968. — Vol. 33, № 1. — P. 173–197.
61. Waring M. Binding of drugs to supercoiled circular DNA: evidence for and against intercalation // *Progr. Mol. Subcell. Biol.* / Springer-Verlag-Berlin, Heidelberg, New York, 1971. — № 2. — P. 216–315.
62. Watson J.D., Crick F.H.C. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid // *Nature.* — 1953. — Vol. 171. — P. 737–738.
63. Wunderlich F., Giese G. The nuclear matrix: modulator of membrane fluidity? / In: “International Cell Biology 1980-1981” / H.G.Schweiger ed., Springer-Verlag-Berlin, Heidelberg, 1981. — P. 205–213.
64. Wunderlich F., Herlan G. A reversibly contractile nuclear matrix. Its isolation, structure and composition // *J. Cell Biol.* — 1977. — Vol. 73, № 2. — P. 271–278.
65. Yuing C., Gorski J. DNA topology regulates rat prolactin gene transcription // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 1994. — Vol. 99. — P. 183–192.

Поступила 09.06.2005.

УДК 575.113:636.1/9

N.M. Suraeva

THE GENETIC AND EMBRYOLOGIC ASPECTS OF TRANSGENIC ANIMALS GROWING

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

ABSTRACT

Gene transfer technology provides the ability to genetically manipulate somatic and germ cells of domestic animals. The further investigations are directed to study the transgene uptake efficiencies in generation, and to increase the efficacy of these genes integration and expression. This could be achieved by improvements in transgene design and by selection the genetically modified cells in terms of transfection.

Key words: transgenesis, integration, expression, transfection, domestic animals, genetic "knock-out".

Н.М. Сураева

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Технология трансгенеза позволила изменять генотип соматических и половых клеток домашних животных. Дальнейшие исследования направлены на изучение характера наследования чужеродных генов в потомстве, а также на повышение эффективности интеграции и экспрессии, что может быть достигнуто подбором регуляторных участков генных конструкций и предварительной селекцией трансфицированных клеток в культуре.

Ключевые слова: трансгенез, интеграция, экспрессия, трансфекция, домашний скот, генетический нокаут.

ВВЕДЕНИЕ

Успехи в технологии получения рекомбинантных ДНК открыли возможность создания новых генотипов путем введения, удаления или изменения генома животного уже в первом поколении. Впервые трансгенез у млекопитающих был достигнут в начале 1980-х гг. на мышах. J. Gordon et al. [24] показали, что экзогенная ДНК может быть интегрирована путем инъекции в пронуклеус зиготы мыши. Такие модифицированные животные были названы *трансгенными*. Другие исследователи в короткие сроки повторили данные эксперименты, и метод микроинъекции длительное время использовался как единственный для создания трансгенных мышей, а затем и других видов животных.

В настоящее время различные виды животных (и растений), а именно, амфибии, крупный рогатый скот, птицы, рыбы, насекомые, нематоды, свиньи, кролики, козы подверглись генетической модификации. Благодаря развитию методов введения ДНК в хромосомы зародыша появилась возможность использования трансгенных животных в качестве моделей для

фундаментальных и прикладных научных исследований или как новых источников для получения фармацевтических продуктов и органов для трансплантации человеку.

Однако чужеродная ДНК встраивается случайным образом, каждое трансгенное животное является уникальным объектом в отношении как своего генома, так и характера, и уровня экспрессии встроенного гена. Некоторая степень определенности фенотипического проявления встроенного гена в организме животного значительно повышается при использовании технологии переноса гена посредством гомологичной рекомбинации (*gene targeting*). Хотя данная технология не позволяет ограничить влияние на экспрессию экзогенного гена окружающих его эндогенных генов, однако можно предположить, что все независимо полученные друг от друга трансгенные животные будут иметь примерно одинаковый и предсказуемый уровень экспрессии, а их потомки будут передавать тот же самый изначально встроенный ген и в том же самом месте генома [62].

1. ИНТЕГРАЦИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В ГЕНОМ ЖИВОТНЫХ

1.1. Инфицирование эмбрионов животных ретровирусными векторами

со встроенными структурными генами

Интеграция экзогенного гена с помощью ретровирусных векторов происходит путем инфекции, при этом только одна провирусная копия встраивается в определенное для вирусного генома место в хромосоме хозяина [64]. С помощью данной технологии можно инфицировать путем добавления в среду культивирования ретровирусного вектора от 10 до 50 % эмбрионов. При этом структурный ген интегрируется случайным образом по отношению к геному хозяина, что приводит к неконтролируемой экспрессии чужеродного гена. Кроме того, при ретровирусной интеграции возникают и другие нежелательные моменты, а именно: встраивание происходит сразу в нескольких местах хромосомной ДНК, и поэтому у животных увеличивается вероятность генетических нарушений; в случае инфекции эмбрионов на более поздних стадиях развития (морулы или бластоцисты) интеграция ретровирусных векторов происходит не во всех бластомерах, т. е. клетки, расположенные внутри эмбрионов, оказываются недоступными для вируса, и животные получают мозаичными [7]; в связи с тем обстоятельством, что интеграция ретровирусных последовательностей по своей природе тяготеет к транскрипционно активным участкам генома, часто в местах встраивания встречаются различные перестройки, делеции, дубликации или транслокации последовательностей ДНК хозяина [48], которые могут приводить к мутационным изменениям и нарушать функционирование эндогенных генов, хотя большинство таких мутаций, вызванных инфекцией эмбрионов и ЕК-клеток ретровирусами или введением рекомбинантной ДНК в пронуклеусы зигот, рецессивны или имеют эмбриональный летальный фенотип [65]; оказалось, что ретровирусные векторы могут быть использованы для переноса только коротких последовательностей трансгена не более 9–10 т.н.п. [34].

Были также опубликованы данные об эписомной репликации у мышей и передаче потомкам плазмиды, кодирующей Т-антиген вируса полиомы. Эта плазида циркулировала в клетках различных тканей организма в виде автономных кольцевых молекул ДНК, встраивающихся в хромосомную ДНК животного только во время мейоза [45].

Кроме этого, было обнаружено, что ретровирусы в естественных условиях могут трансдуцировать потенциально онкогенные гены клетки-хозяина. Таким образом, несмотря на техническую простоту самой процедуры встраивания трансгена с помощью вирусных векторов, ряд указанных выше недостатков не позволяют широко использовать данный метод.

1.2. Интеграция невирусных плазмид

1.2.1. Микроинъекция

В отличие от ретровирусной интеграции, при микроинъекции гена число встроенных копий инъекциро-

ванной ДНК может значительно меняться от единиц до сотен копий на клетку [1; 60]. Обычно множественные копии ДНК молекул стабильно интегрируются в геном хозяина в виде тандема, ориентируясь по отношению друг к другу по принципу голова к хвосту. Предполагается, что инъекцированные молекулы ДНК ассоциируются через гомологичную рекомбинацию до интеграции, а затем уже встраиваются в единственное место в хромосоме. Вероятно, местом интеграции служат случайные разрывы в хромосоме, которые могут быть вызваны репарационными ферментами в ответ на инъекцию молекул ДНК со свободными концами [10].

Особая ситуация возникает в случае, когда трансгенные родители оказываются мозаичными, то есть интегрированный ген присутствует только в части половых (и соматических) клеток. Известно, что мозаицизм встречается у 85 % трансгенов после микроинъекции [78]. Так как интеграция происходит во время репликации ДНК, только одна из двух делящихся клеток может содержать инъекцированную последовательность, а если встраивание произойдет не на стадии зиготы, а позднее, то вероятность передачи потомкам чужеродных генов становится еще ниже [2; 59; 65; 73].

Так, после микроинъекции тимидинкиназного гена под контролем МТ промотора некоторые трансгенные мыши передали только 6 % своим потомкам интегрированный ген [60]. Сами же потомки, только самки, передавали ген в соответствии с Менделевским распределением. Трансгенные самцы хотя и были способны к размножению, однако никогда не передавали тимидинкиназный ген своим потомкам. Предполагается, что в процессе сперматогенеза происходит разрушение введенного гена. Аналогичная картина наблюдалась и при микроинъекции альфа-фетопротеинового гена [43]. Из 1200 родившихся мышей от 5 самцов одной трансгенной линии только самки оказались трансгенными.

Нежелательным последствием процедуры микроинъекции чужеродного гена является также гибель эмбрионов на различных стадиях развития. При инъекции гена гормона роста были получены две линии мышей с рецессивной летальной мутацией, проявляющейся в ранний постимплантационный период [19], а при интеграции β -глобинового гена кролика была выявлена линия мышей, в которой эмбриональные мутантные гомозиготы прикреплялись к матке, но затем погибали [50].

В опытах М.И. Прокофьева и соавт. [3] 3 из 4 трансгенных линий самок кроликов с встроенным геном человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора утратили способность к размножению. Более того, в конце беременности погибали не только плоды, но и беременные крольчихи. Возможно, в данном случае негативное влияние на трансгенов оказывал чужеродный белок.

Очевидно, что упомянутые выше явления снижают эффективность интеграции чужеродных генов в геном животных, особенно если учесть, что существует определенный дефицит эмбриологического материала

сельскохозяйственных животных, хотя в настоящее время уже известны методы контроля периода овуляции и созревания *in vitro* ооцитов домашних животных [4; 8; 30; 63].

1.2.2. Липофекция

Липосомы представляют собой искусственно созданные везикулы, которые обладают способностью транспортировать в клетки животных чужеродные гены, в том числе и половые. Липосомы состоят из двойного слоя липидов. Размеры липосом варьируют от 100 нм до нескольких мкм. Они могут нести отрицательный или положительный заряд. Для трансгенеза обычно смешивают двухслойные липосомы и водный раствор ДНК [23].

При контакте с клеткой-мишенью липосомы могут взаимодействовать с клеточной мембраной различными способами:

- 1) абсорбировать на клеточной мембране;
- 2) проникать путем эндоцитоза;
- 3) встраиваться в мембрану [70].

Трансгенные молекулы проникают в цитоплазму только в двух последних случаях. Недавно стали использовать, в том числе и для коммерческих целей, поликатионные липиды, например, Lipofectin™, LipofectinAMINE™, Transfectace™, DOTAP и др. [14]. Эти липиды стабильны и обладают высокой эффективностью трансфекции.

Однако, несмотря на эффективный перенос с помощью липосом трансгена в цитоплазму соматических клеток, лишь в очень небольшое количество ядер чужеродная ДНК будет встроена, поэтому трансгенная экспрессия со временем исчезает.

Проводятся исследования и по получению полового трансгенеза с использованием липидов [21; 58], однако интеграция трансгена также остается низкой у кур, хотя некоторый успех был достигнут при переносе липидами трансгена в сперматозоиды [69].

В перспективе, скорее всего, усилия по эффективному использованию липофекции для получения половых трансгенов будут направлены на встраивание в липосомный ДНК-комплекс белков, локализованных в ядре [6], что позволит повысить уровень экспрессии и увеличить частоту встраивания в хромосому. Такие же возможности могут открыться, если с помощью липосом перенести большие молекулы ДНК (более 150 т.н.п.) [72], а именно, искусственные минихромосомы с центромерами, теломерами и областями репликации вдобавок к структурным генам, промоторам и энхансерам.

1.2.3. Электропорация

Метод электропорации основан на процессе временной перфорации клеточной мембраны с помощью мощного электрического импульса и проникновения молекул ДНК из окружающей среды через как цитоплазматическую, так и ядерную мембраны [47]. Электропорация представляет собой быстрый и недорогой метод введения чужеродной ДНК в культивируемые клетки млекопитающих и других животных. При этом,

как правило, не происходит мутаций в геноме хозяина, может быть встроено в отличие от микроинъекции ограниченное количество копий на геном (от 1 до 20) и могут быть перенесены большие молекулы трансгена (более 150 т.н.п.). К ограничениям использования данного метода относят:

- 1) потребность в специальном оборудовании для электропорации;
- 2) необходимость подбора оптимальных условий для каждого типа клеток;
- 3) низкая эффективность интеграции (обычно только у 0,01 % обработанных клеток удается получить геномную интеграцию трансгена) [13].

Например, низкая эффективность интеграции не позволяет использовать данный метод для электропорации зигот млекопитающих, т. к. для получения одного трансгенного теленка или овцы потребуется примерно 1000 животных-доноров. Более оптимистические прогнозы высказываются в отношении таких видов животных, у которых можно выделить большое количество половых клеток, например, у рыб или птиц [32].

С другой стороны, электропорация является эффективным способом введения экзогенной ДНК в ES клетки [16] и при использовании технологии клонирования в сочетании с *gene targeting* [51].

1.3. Интеграция чужеродных генов путем гомологичной рекомбинации (*gene targeting*)

В связи с тем, что при использовании вышеописанных методов введения чужеродных генов интеграция в хромосому хозяина происходит случайно, экспрессия трансгена оказывается или невысокой, или временной, или может совсем отсутствовать. Главной причиной таких нарушений является влияние окружающих генов и промоторов на функции встроеного гена, так называемый эффект положения. По-видимому, решением проблем трансгенной экспрессии могло бы быть устранение этого эффекта на этапе интеграции экзогенных генов. И такое решение было найдено с помощью использования технологии *gene targeting* [17].

Большинство стратегий *gene targeting* основано на гомологичной рекомбинации. При этом в вектор обычно включают 2 области, комплементарные выбранной геновой последовательности хозяина, между которыми находятся негомологичные участки и маркер устойчивости к антибиотикам. Возможности данной технологии позволяют выключать эндогенный ген (*gene 'knockout'*), регулировать уровень экспрессии эндогенных генов или заменять эндогенный ген гомологичным другого вида.

В настоящее время данный подход применяется в отношении стволовых эмбриональных клеток и при клонировании, но не при микроинъекции, так как в последнем случае исключена возможность селекции клеток с интегрированным геном. Более того, в отличие от инъекции в пронуклеус, при использовании технологии *gene targeting* интегрированный ген обычно оказывается рецессивным. Поэтому для получения фенотипического

признака необходимо скрещивание трансгенных животных с целью получения особей с изменениями в обеих аллелях. Такая селекция на мышах не вызывает особых технических трудностей, тогда как при работе с домашними животными могут потребоваться годы, хотя недавно было предложено с помощью клонирования получить трансгенные эмбрионы сначала с одной аллелью, а затем трансфецировать клетки из этих эмбрионов другой аллелью и снова провести клонирование [44].

2. ЭКСПРЕССИЯ ВСТРОЕННЫХ ГЕНОВ У ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

2.1. Экспрессия трансгена, интегрированного в составе ретровирусных векторов

Первые эксперименты по интеграции ретровирусных векторов в геном мышей показали, что они не способны к экспрессии и репликации [35; 36]. Причина этих неудач скрывалась в структуре самого провируса.

Провирус состоит из следующих регуляторных и структурных элементов: на обоих концах провируса расположены длинные терминальные повторяющиеся последовательности (LTR), содержащие сигналы для инициации и терминации транскрипции, следующие последовательности необходимы для обратной транскрипции и вирусной интеграции, затем идут участки ДНК, кодирующие белки упаковки.

Оказалось, что вирусные LTR в клетках ранних эмбрионов препятствуют вирусной репликации, так как содержат вирусный промотор и элементы контроля транскрипции, которые не функционируют на этой стадии развития. Вероятно, этот белок можно убрать путем замены вирусного LTR промотора в ретровирусном векторе собственным промотором структурного гена. Такие эксперименты по введению 2 ретровирусных векторов были проведены с β -глобиновым геном под контролем его собственного промотора и промотора тимидинкиназного гена. При этом экспрессия была зафиксирована в гемопоэтических клетках и во всех видах тканей трансгенных мышей, соответственно для каждого промотора [38].

При культивировании инфицированных эмбриональных клеток также наблюдалась транскрипционная пассивность, которая была связана с тем, что происходило метилирование пронуклеусов [41]; не функционировал вирусный энхансер [77]; возможно, присутствовала супрессорная активность или не было активирующих факторов [76] в эмбриональных клетках. Вероятно, аналогичные явления имеют место и при интеграции ретровирусных векторов в геном животных. Например, при трансфекции с помощью ретровирусов бактериального гена *gpt* предимплантированных эмбрионов мышей было обнаружено, что провирусная последовательность высоко метилирована и не экспрессируется у трансгенных животных [41]. Однако после инъекции этим животным 5-азациитидина была зафиксирована транскрипция (мРНК) интегрированного гена.

Известны также провирусы, которые после интеграции в геном мышей экспрессируются в специфиче-

ских тканях [75] или на определенной стадии развития [37; 39]. Так, при культивировании 8-клеточных эмбрионов мыши на монослое клеток, продуцирующих рекомбинантный ретровирус, были получены трансгенные животные с геном вируса полиомы. Трансгенные мыши были мозаичными и экспрессировали вирусные 35 s и 21 s РНК только в селезенке, 35 s и 30 s РНК только в мозгу [75].

После инфекции эмбрионов мышей вирусом лейкемии мышей Молони интегрированный ретровирус экспрессировался в эмбриогенезе после рождения и в конце онтогенеза [37]. В этих случаях на активность вируса, по-видимому, оказывало влияние хромосомное окружение в месте его интеграции.

Чужеродные гены были впервые успешно внедрены в зародышевую линию кур при использовании репликативно нормального вируса лейкоза птиц ALV или вируса ретикулоэндотелиоза (REV) [66; 67]. Векторы были инъецированы в бластомеру или внутрибрюшинно вылупившемуся цыпленку, и были получены трансгенные животные, которые передавали потомству интегрированный провирус. Последующая передача провируса происходила по законам Менделя, что свидетельствовало о возможности получения трансгенных птиц с помощью вирусных векторов.

Необходимость получения домашней трансгенной птицы привело к созданию репликативно дефектных вирусных векторов. Трансгенные цыплята были получены с помощью репликативно дефектного REV-вектора, инъецированного под бластомеру [5]. Около 8 % вылупившихся самцов несли ген устойчивости к неомицину и передавали вектор потомству в 2–8 % случаев. Тот же REV-вектор использовался для постоянной экспрессии гормона роста кур в эмбрионах. Около 50 % эмбрионов имели повышенные концентрации гормона роста, но цыплята не вылупились.

Таким образом, экспрессия трансгена, интегрированного ретровирусным вектором, нестабильна и, скорее всего, непредсказуема, т. к. встраивание чужеродной ДНК происходит случайно [40].

Однако совсем недавно появилась работа об успешном использовании репликативно-дефектного ретровирусного вектора в качестве переносчика экзогенных генов и получении нескольких поколений трансгенных птиц, стабильно передающих экспрессирующий ген бактериальной β -галактозидазы в соответствии с Менделеевским распределением [54]. Ранее было показано, что данный вектор может быть получен с высоким титром, он не способен к репликации, не имеет вируса-помощника, функционирует в различных линиях клеток, способен инфицировать большое количество клеток кур, инфекция не влияет на клеточную пролиферацию, но обеспечивает у вылупившихся цыплят экспрессию бактериальной β -галактозидазы [53].

2.2. Регуляция экспрессии трансгена, интегрированного в составе невирусных плазмид

В первых экспериментах по микроинъекции была зафиксирована только слабая и очень изменчивая ак-

тивность встроенных генов, которая, по-видимому, зависела от места этих генов в хромосоме. Вскоре выяснилось, что присутствие в составе вводимых плазмид прокариотических векторных последовательностей оказывает ингибирующее действие на соответствующую экспрессию некоторых генов, таких, как β -глобин, α -актин и α -фетопротеин [12; 38; 45]. Поэтому в настоящее время исследователи убирают прокариотическую последовательность, избавляясь тем самым от возможных нежелательных воздействий этих последовательностей на экспрессию, и добавляют различные регуляторные последовательности с целью получения контролируемой экспрессии. С другой стороны, гены, кодирующие иммуноглобулин, эластазу и коллаген, по-видимому, менее чувствительны к присутствию прокариотических ДНК и часто экспрессируются независимо от хромосомного положения [29; 46; 56].

Получить у трансгенных животных направленную и специфичную экспрессию невозможно без изучения механизмов регуляции генной активации. В генах млекопитающих на 5' концах были обнаружены очень похожие последовательности, названные блоком Goldber Hogness. Предполагается, что они являются местами связывания для РНК-полимеразы II, то есть местами инициации транскрипции. Очевидно, блок Goldber Hogness является важнейшим компонентом составного промотора, который постоянно находится в активном состоянии, обеспечивая у большинства генов млекопитающих очень низкий базальный уровень транскрипции. Затем были открыты другие специфические регуляторные элементы. Эти элементы, названные энхансерами, были связаны со специфическим усилением транскрипции генов вирусов и млекопитающих [22; 42]. Считается, что энхансеры облегчают связывание РНК-полимеразы II с блоком Goldber Hogness и тем самым повышают эффективность транскрипции. Предполагается, что энхансеры отвечают за тканеспецифичную активность структурных генов, так как при введении этих элементов в плазмиды у трансгенных животных наблюдалась тканеспецифичная экспрессия интегрированных генов [28].

Было показано для некоторых генов, что энхансерные элементы расположены в 3' и 5' фланкирующих последовательностях структурного гена, при этом на 5' конце они или непосредственно соединялись с промотором, или были на некотором расстоянии от него. Некоторые энхансерные последовательности идентифицировались с помощью трансгенных мышей, когда в их эмбрионы последовательно вводили ДНК конструкции с различными длинами фланкирующих последовательностей.

Так, идентификация энхансерных последовательностей у семейства β -глобулиновых генов позволила детально разобраться в механизме активации этих генов. В процессе развития организма различные глобиновые гены — эмбриональные, зародышевые и взрослые, — последовательно экспрессируются в эритроидных клетках. Интегрированные в наследственные

линии мышей 2-го типа, клонированных глобиновых генов человека — зародышей и взрослых особей, экспрессировались точно в соответствующей стадии развития [12], а специфическая активация на каждой стадии зависела от энхансерных элементов, расположенных как на 3', так и 5' концах. При этом на экспрессию этих генов, вероятно, влияло хромосомное окружение в месте интеграции, так как уровень экспрессии не зависел от числа копий встроенного гена, и трансгены никогда не синтезировали чужеродный β -глобин в концентрациях, сравнимых с эндогенным β -глобином. Когда же с обоих концов гена были удалены нуклеотидные последовательности, расположенные на расстоянии от 20 до 50 т.н.п., то инъекцированный ген β -глобина стал экспрессироваться на том же уровне, что и эндогенный, и даже выше, в прямой зависимости от числа копий [29]. На основе этих данных было сделано предположение, что эти последовательности контролируют доступность к β -глобиновому локусу активирующих тканеспецифических факторов или они являются основными связывающими местами и представляют собой энхансерные элементы, которые могут воздействовать на структурные гены даже на значительном расстоянии.

2.2.1. Использование тканеспецифичных промоторов

По-видимому, каждый ген имеет свои регуляторные последовательности (промотор и энхансеры), и они расположены в специфических местах структурного гена. В опытах, в которых микроинъекцировали в эмбрионы мышей пары генов с интронами и без них, было продемонстрировано, что регуляторные последовательности, определяющие уровень транскрипции, расположены в интронах [11].

Так, гены эластазы [73], γ -кристаллина [26] и протамина [61], имеют компактный промотор с энхансерными элементами, где вся необходимая информация для тканеспецифичной генной экспрессии содержится внутри нескольких сотен нуклеотидных пар, расположенных в месте инициации транскрипции. У других генов тканеспецифические энхансерные элементы удалены на значительные расстояния от их промоторов. Например, элемент, находящийся в 10 т.н.п. от альбуминового промотора, необходим для специфической экспрессии этого гена в печени, а элемент, удаленный на 5 т.н.п. от 3' конца гена Т-клеточного рецептора, контролирует специфическую экспрессию в Т-лимфоцитах [74]. 3 различных энхансерных элемента ответственны за тканеспецифичную экспрессию гена б-фетопротеина, они расположены в 7 т.н.п. от 5' конца генной последовательности [43]. Так, иммуноглобулиновый энхансер обеспечивает экспрессию в В-лимфоцитах [71], а энхансеры гена SV 40 Т-антигена в различных тканях [9].

Известны несколько генов, которые экспрессируются одновременно в нескольких тканях. К ним относится МТ ген, экспрессирующийся во многих тканях клеток при их контакте с тяжелыми металлами (таки-

ми, как цинк или кадмий) и глюкокортикоидами [20]. Или, например, экспрессия генов главного комплекса гистосовместимости обнаружена в большинстве тканей взрослого организма, тогда как на ранних эмбриологических стадиях эти гены неактивны [57]. Если регуляторные последовательности таких генов соединить с кодирующими последовательностями интересующих генов и интегрировать в геном животного, то гены будут экспрессироваться в большинстве тканей полученных трансгенных животных.

Впервые такие эксперименты были проведены с МТ геном при инъекции в пронуклеусы зигот мышей плазмиды, состоящей из промотора гена МТ и гена гормона роста крысы. В результате были получены «гигантские» трансгенные мыши [59], у которых синтез соматотропина крысы осуществлялся не в специализированном для продукции этого белка органе (гипофизе), а во многих и больше всего в печени. Чужеродный белок нарабатывался в очень высоких количествах и был биологически активным, хотя, как оказалось, для получения животных с повышенной массой совсем не требуется таких высоких концентраций гормона роста. Суперпродукция чужеродного белка оказывала неблагоприятное воздействие и на весь организм трансгенного животного, наблюдались морфологические изменения клеток гипофиза, а некоторые трансгенные мыши были бесплодны [31].

Очевидно, что при получении трансгенных животных с повышенной живой массой более желательной была бы тканеспецифичная экспрессия соматотропина, например, в печени, и в невысоких концентрациях, а для суперпродукции биологически ценных препаратов лучше всего использовать молочные железы, например, у крупного рогатого скота. Регуляторные последовательности нескольких специфичных молочных генов были выделены, охарактеризованы и использованы для специфической экспрессии чужеродных генов в лактирующих молочных железах сначала трансгенных мышей [25], а затем и домашних животных. Так были проведены работы с использованием овечьего β -лактоглобулинового гена, кроличьих WAP генов, α -лактоальбуминового и α -s1-казеиновых генов крупного рогатого скота [49].

2.2.2. Использование промоторов, активирующих экспрессию в ответ на внешние стимулы

В целях практического использования трансгенных животных было бы желательно модулировать экспрессию трансгенов с помощью определенных внешних стимулов. МТ промотор, например, использовался со многими структурными генами, так как позволял управлять экспрессией этих генов путем введения в организм животного тяжелых металлов или глюкокортикоидов. Хотя воздействие на организм животных больших доз металлов может оказать токсичное действие, регуляция экспрессии с помощью гормонов является естественной.

Известно, что стероидные гормоны участвуют в генной регуляции. В настоящее время детально из-

учен механизм гормональной регуляции генной экспрессии [55]. Стероидные гормоны соединяются с белковыми рецепторами в цитоплазме специальных, чувствительных к гормонам клеток, а затем весь комплекс транспортируется в ядро. В ядре образовавшийся комплекс гормона с рецептором узнает специфическую последовательность ДНК, ответственную за гормональную регуляцию, и соединяется с ней, таким образом усиливая активность этих генов. Так, у трансгенных мышей после инъекции дексаметазона в 4–6 раз увеличился в крови уровень чужеродного гормона роста и в 4 раза повышалась концентрация матричной РНК этого белка в печени животных [20].

Гормоны оказывали активирующее действие и на некоторые другие промоторы LTR вируса опухоли молочной железы [15], гена трансферина [52]. Эти результаты вселяют надежды на получение у трансгенов регулируемой *in vivo* внешними сигналами экспрессии интегрированных генов.

Значительные успехи в осуществлении контроля над генной экспрессией были достигнуты с использованием тетрациклиновых регуляторных компонентов [27]. Для этой системы необходимо иметь 2 различных трансгена, от которых при скрещивании можно получить потомков, в том числе и двойных гетерозигот. Первый трансген (трансген 1) включает структурный ген, под контролем *tet* операторной последовательности и минимальной промоторной последовательности, другой трансген (трансген 2) состоит из гибридного транскрипционного гена трансактиватора и вирусного тетрациклиносвязывающего домена, соединенного с подходящим тканеспецифическим промотором. Система может находиться в 2 режимах: включена или выключена. Эти варианты основываются на поочередной активности функционально различных трансактиваторов. При этом экспрессия структурного гена может быть выключена при введении тетрациклина трансгенным мышам и включена с его удалением. В последующих исследованиях удалось соединить оба контролирующих элемента в одной плазмиде. При этом при прекращении введения антибиотика уровень экспрессии репортерного гена у трансгенных мышей возрастал в 800 раз [68].

2.2.3. Использование *gene targeting* технологии

Разработанная в последние годы технология создания плазмид на основе гомологичной рекомбинации [33] открыла принципиально новый подход к созданию трансгенных животных. Встраивание экзогенного гена в данном случае не происходит по принципу случайной мутации, а является направленной (неслучайной) модификацией одного из эндогенных генов. Например, в молоке трансгенных коз или коров продуцируются не собственные белки, а человека [17], или осуществляется замена собственного промотора новым, который позволит модулировать экспрессию эндогенного гена [18].

Однако технология *gene targeting* не только расширяет методы контроля и регуляции экспрессии встро-

енных генов, но и создает новые возможности в этом направлении. Так, например, эта технология позволяет выключать функции эндогенных генов (gene 'knock-outs'). Благодаря gene targeting открывается обширная область практического применения для пересадки трансгенных органов от животных человеку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность получения трансгенных животных наиболее часто используемыми в настоящее время методами микроинъекции и клонирования остается низкой. Кроме того, во многих экспериментах трансгенные животные имели повышенный вес при рождении, аномалии в развитии или вовсе не доживали до половозрелости. Поэтому, очевидно, необходимо тщательное изучение и подбор как состава генных конструкций, так и мест интеграции, трансгенной экспрессии (интервал, уровень, тканеспецифичность) и, наконец, характеристики самого трансгенного продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ениколопов Г.Н., Захарченко В.И., Грацук М.А. и др. Получение трансгенных кроликов, содержащих и экспрессирующих ген соматотропина человека // Доклады Академии Наук. — 1988. — Т. 299, № 5. — С. 1246–1249.
2. Прокофьев М.И. Получение человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора с молоком трансгенных кроликов // Российский биотерапевтический журнал. — 2004. — Т.3, № 2. — С. 7–8.
3. Прокофьев М.И., Городецкий С.И., Мезина М.Н. и др. Создание трансгенных кроликов, продуцирующих с молоком человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор // Сельскохозяйственная биология. — 2003. — № 6. — С. 49–54.
4. Сураева Н.М., Кесян А.З., Прокофьев М.И. Оптимальные приемы капацитации спермы быков для оплодотворения яйцеклеток // Вестник РАСХН. — 1993. — № 4. — С. 49–51.
5. Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T et al. Germline transmission of exogenous genes in the chicken // Science. — 1989. — Vol. 243. — P. 533–535.
6. Boulikas T. Nuclear localization signal peptides for the import of plasmid DNA in gene therapy // Int. J. Oncol. — 1997. — Vol. 10(2). — P. 301–309.
7. Braas G., Searle P.F., Slater N.K., Lyddiatt A. Strategies for the isolation and purification of retroviral vectors for gene therapy // Bioseparation. — 1996. — Vol. 6(4). — P. 211–228.
8. Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L. et al. Normal development following in vitro fertilization the cow // Biol.Reprod. — 1982. — Vol. 27. — P. 147–158.
9. Brinster R.L., Chen H.Y., Messing A. et al. Transgenic mice harboring SV40 t-antigen genes develop characteristic brain tumors // Cell. — 1984. — Vol. 37. — P. 367–379.
10. Brinster R.L., Chen Y.Y., Trumbauer M.F. et al. Factors effecting the efficiency of introducing foreign DNA into vice by microinjecting eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 4438–4442.
11. Brinster R.L., Allen J.M., Behringer R.R. et al. Intron increase transcriptional efficiency in transgenic mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1988. — Vol. 85. — P. 836–840.
12. Chada K., Magram J. and Costantini F. An embryonic pattern of expression of human fetal globin gene in transgenic mice // Nature. — 1986. — Vol. 319. — P. 685–688.
13. Chang, C.C., Saunders, J.A., Chassy, B.M., Sowers, A.E. Overview of electroporation and electrofusion. In: Chang, C.C., et al. (Ed.) Guide to electroporation and electrofusion. Academic Press Inc. San Diego, 1992.
14. Chisholm V. High efficiency gene transfer into mammalian cells. In: Glover, D.M., Hames, B.D., (Eds.), DNA Cloning 4-a Practical Approach: Mammalian Systems, second ed., IRL Press, Oxford, 1995.
15. Choi Y., Henrerd D., Lee I. and Ross S.R. The mouse mammary tumor virus long terminal repeat directs expression in epithelial and lumphoid cells of different tissues in transgenic mice // J. Virol. — 1987. — Vol. 61. — P. 3013–3019.
16. Chu G., Hayakawa H., Berg P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA // Nucleic Acids Res. — 1987. — Vol. 15(3). — P. 1311–1326.
17. Clark A.J. Gene expression in the mammary gland of transgenic animals // Biochem. Soc Symp. — 1998. — Vol. 63. — P. 133–140.
18. Clark A.J., Burl S., Denning C., Dickinson P. Gene targeting in livestock: a preview // Transgenic Research. — 2000. — Vol. 9. — P. 263–275.
19. Covarrubias L., Hishida Y. and Mints B. Early postimplantation embryo lethality due to DNA rearrangement in a transgenic mouse strain // Proc. Natl. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 6020–6024.
20. Durnan L.M., Hoffman J.S., Quaiife C.J. et al. Induction of mouse metallothionein-1 mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 1053–1056.
21. Ebara F and Fujihara N. Reproductive characteristics of transgenic (TG) chickens carrying an exogenous gene // Asian J. Androl. — 1999. — Vol. 1. — P. 139–144.
22. Eprussi A., Church G.M., Tonewa S. and Cibbert W. Linege-specific interaction of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vitro // Science. — 1985. — Vol. 27. — P. 134–140.
23. Felgner P.L. Improvements in cationic liposomes for in vivo gene transfer // Hum. Gene Therapy. — 1996. — Vol. 7(15). — P. 1791–1793.
24. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J. et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjections of purified DNA // Proc.Natl.Acad. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 7380–7384.
25. Gordon K, Lee E., Vitale I.A. et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse

- milk // *BioTechnology*. — 1987. — Vol. 5. — P. 1188–1189.
26. *Goring D.R., Rossant J., Claroff S. et al.* In situ expression of β -galactosidase in lenses of transgenic mice with a γ -crystallin lac z gene // *Science*. — 1987. — Vol. 235. — P. 456–458.
27. *Gossen M., Freundlieb S., Bender G. et al.* Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells // *Science*. — 1995. — Vol. 268. — P. 1766–1769.
28. *Grosveld F., Assendelft G.B., Greaves D.R. and Kollias G.* Position independent high-level expression of the human-globin gene in transgenic mice // *Cell*. — 1987. — Vol. 51. — P. 975–985.
29. *Grosschedl R., Weaver D., Baltimore D., Conctantini C.* Introduction of a λ immunoglobulin gene into the mouse germ line: Specific expression in lymphoid cell and synthesis of functional antibody // *Cell*. — 1984. — Vol. 38. — P. 647–658.
30. *Grozet N., Huneau D., Desinedt V. et al.* In vitro fertilization with normal development in the sheep // *Gamete Res.* — 1987. — Vol. 52. — P. 308–314.
31. *Hammer R.E.J., Palmiter R.D. and Brinster R.L.* Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene // *Nature*. — 1984. — Vol. 311. — P. 65–67.
32. *Hong Y.H., Moon Y.K., Jeong D.K., Han J.Y.* Improved transfection efficiency of chicken gonadal primordial germ cells for the production of transgenic poultry // *Transgenic Research*. — 1998. — Vol. 7. — P. 247–252.
33. *Hooper M.L.* Embryonal Stem Cells: Introducing Planned Changes into the Germline. In: Evans HJ (ed.) Harwood Academic Publishers, Switzerland, 1992.
34. *Hu W.S., Pathak V.K.* Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy // *Pharmacol. Rev.* — 2000. — Vol. 52(4). — P. 493–511.
35. *Jaenisch R. and Mintz A.* Simian virus 40 DNA sequences in DNA of health adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA // *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. — 1974. — Vol. 71. — P. 1250–1254.
36. *Jaenisch R.* Germ line integration and Mendelian transmission of exogenous Moloney leukemia virus // *Prog. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1976. — Vol. 73. — P. 1260–1264.
37. *Jaenisch R., Jahner L., Nobis P. et al.* Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice // *Cell*. — 1981. — Vol. 24. — P. 519–529.
38. *Jaenisch R.* Transgenic animals // *Science*. — 1988. — Vol. 240. — P. 1468–1474.
39. *Jahner D., Stuhmann H., Stewart C.L. et al.* De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis // *Nature*. — 1982. — Vol. 298. — P. 623–628.
40. *Jahner D. and Jaenisch R.* Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity // *Nature*. — 1985. — Vol. 315(6020). — P. 594–597.
41. *Jahner D., Haase R., Mulligan R. and Jaenisch R.* Insertion of the bacterial gpt gene into the germ line of mice by retroviral infection // *Prog. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1985. — Vol. 82. — P. 6927–6931.
42. *Khoury G. and Gruss P.* Enhancer elements // *Cell*. — 1973. — Vol. 33. — P. 313–314.
43. *Krumlauf R., Chapman V.M., Hammer R.E. et al.* Differential regulation of δ -fetoprotein genes on the inactive X chromosome in extraembryonic and somatic tissues of transgenic mice // *Nature*. — 1985. — Vol. 319. — P. 224–226.
44. *Kubota C., Yamakuchi H., Todoroki J. et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture // *Proc. Natl. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97. — P. 990–995.
45. *Leopold F., Vailly J. et al.* Germ line maintenance of plasmids in transgenic mice // *Cell*. — 1987. — Vol. 51. — P. 885–886.
46. *Lovrll-Badge R.H., Bygrave A.E., Bradley A. et al.* Transformation of embryonic stem cells with the human type-II collagen gene and its expression in chimeric mice // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* — 1985. Vol. 50. — P. 707–711.
47. *Lurquin P.F.* Gene transfer by electroporation // *Mol. Biotechnol.* — 1997. — Vol. 7(1). — P. 5–35.
48. *Mahon K.A., Overbeek P.A. and Westhal H.* Prenatal lethality in a transgenic mouse line in the result of a chromosomal translocation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1988. — Vol. 85. — P. 1165–1168.
49. *Maga E.A. and Murray J.D.* Mammary gland expression of transgenes and potential for altering the properties of milk // *Bio/Technology*. — 1995. — Vol. 13. — P. 1452.
50. *Mark W.H., Signorelli K. and Lacy E.* An insertional mutation in a transgenic mouse line result in developmental arrest at day 5 of gestation // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* — 1985. — Vol. 50. — P. 453–464.
51. *McCreath K.J., Howcroft J., Campbell K.H.S. et al.* Production of genotargeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells // *Nature*. — 2000. — Vol. 405(6790). — P. 1066–1069.
52. *McKnight G.S., Hammer R.E., Kuenzel E.A. and Brinster R.L.* Expression of the chicken transferrin gene in transgenic mice // *Cell*. — 1983. — Vol. 34. — P. 335–441.
53. *Mikawa T., Cohen-Gould L., Fischman D.A.* Clonal analysis of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective retrovirus. III: Polyclonal origin of adjacent ventricular myocytes // *Developmental Dynamics*. — 1992. — Vol. 195. — P. 133–141.
54. *Mozdziak P.E., Borwornpinyo S., McCoy D.W., and Petite J.N.* Development of transgenic chickens expressing bacterial β -galactosidase // *Developmental Dynamics*. — 2003. — Vol. 226. — P. 439–445.
55. *O'Malley B.W.* Steroid hormone action in eukaryotic cells // *Clin. Inv.* — 1984. — Vol. 74. — P. 307–312.
56. *Ornitz D.M., Palmiter R.D., Hammer R.E. et al.* Specific expression of an elastase-human growth hor-

mone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice // *Nature*. — 1985. — Vol. 313. — P. 600–603.

57. *Ozato K., Wan Y.J. and Orrison B.M.* Mouse major histocompatibility class I gene expression begins at midsomite stage and is inducible in earlier-stage embryos by interferon // *Prog. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1985. — Vol. 82. — P. 2427–2431.

58. *Pain B., Chenevier P., Samarut J.* Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies // *Cells Tissues Organs*. — 1999. — Vol. 165(3-4). — P. 212–219.

59. *Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E. et al.* Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes // *Nature*. — 1982. — Vol. 300. — P. 611–615.

60. *Palmiter R.D. and Brinster R.L.* Germline transformation of mice // *Ann. Rev. of Genetics*. — 1986. — Vol. 20. — P. 3–60.

61. *Peshon J.J., Behringer R.R. et al.* Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice // *Proc. Acad. Sci. USA*. — 1987. — Vol. 84. — P. 5316–5319.

62. *Robl G.M., Cibelli P.G., Golueke J.J. et al.* Embryonic stem cells chimeras and somatic cell nuclear transfer for production of transgenic cattle. — *Transgenic Animals in Agriculture*. — CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1999. — P. 79–86.

63. *Prokofiev M.I., Ernst L.K., Suraeva N.M. et al.* Bovine oocyte maturation, fertilization and further development in vitro and after transfer into recipient // *Theriogenology*. — 1992. — Vol. 38. — P. 461–469.

64. *Rubinstein J.L.R., Nicolas I.F. and Jacob F.* Introduction of nes into preimplantation mouse embryos by use of a detective recombinant retrovirus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1986. — Vol. 8. — P. 366–368.

65. *Rusconi S, Kohler G.* Transmission and expression of a specific pair of rearranged immunoglobulin u and k genes in a transgenic mouse line // *Nature*. — 1985. — Vol. 314. — P. 330–334.

66. *Salter D.W., Smith E.J., Hughes S.H. et al.* Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chick germline // *Virology*. — 1987. — Vol. 157. — P. 236–240.

67. *Salter D.W., Smith E.J., Hughes S.H. et al.* Gene insertion into the chick germline by retroviruses // *Pol. Sci.* — 1986. — Vol. 65. — P. 1445–1458.

68. *Schultze N., Burki Y., Lang Y. et al.* Efficient control of gene expression by single step of the tetracycline system in transgenic mice // *Nat. Biotechnol.* — 1996. — Vol. 14. — P. 499–503.

69. *Smith K.R.* Sperm cell mediated transgenesis // *Anim. Biotechnol.* — 1999. — Vol. 10(1/2). — P. 1–14.

70. *Smith K.R.* Gene transfer in higher animals: theoretical consideration and key concepts // *J. of Biotechnol.* — 2002. — Vol. 99. — P. 1–22.

71. *Storb U., OrBrien R.L., McMullen M.D. et al.* High expression of cloneimmunoglobulin kappa gene in transgenics is restricted to B lymphocytes // *Nature*. — 1984. — Vol. 310. — P. 238–241.

72. *Strauss W.M., Dausman J., Beard C., Jonson C.* Germ line transmission of yeast artificial chromosome spanning the murine 6-1(I) collagen locus // *Science-New York then Washington*. — 1993. — Vol. 259(5103). — P. 1904.

73. *Swift G.H., Hammer R.E., Mc.Donald R.J. et al.* Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase 1 gene in transgenic mice // *Cell*. — 1984. — Vol. 38. — P. 639–646.

74. *Ulmatsu Y., Ryser S., Dembic Z. et al.* In transgenic mice the introduced functional cell receptor gene prevents expression of endogenous genes // *Cell*. — 1988. — Vol. 52. — P. 831–841.

75. *Van der Putten, Botteri H, Miller F.M et al.* Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors // *Proc. Natl.Acad. USA*. — 1985. — Vol. 82. — P. 6148–6152.

76. *Walker S.K., Seamark R.F., Quinn P. et al.* Culture of pronuclear embryos of sheep in a simple medium // *Proc. 1th Int. Cong. Anim. Reprod.* — 1988. — Vol. 5. — P. 483.

77. *Weiher H, Barklis E et al.* Two distinct sequence elements mediate retroviral gene expression in embryonal carcinoma cell // *J. Virol.* — 1987. — Vol. 61. — P. 2742–2746.

78. *Whitelaw C.B.A., Springbett A.J., Webster J., Clark J.* The majority of G0 transgenic mice are derived from mosaic embryos // *Transgenic Res.* — 1993. — Vol. 2(1). — P. 29.

Поступила 01.10.2004.

УДК 578.891:616-006.444-02

K. D. Nikitin

HEPATITIS C VIRUS AS POSSIBLE ETIOLOGICAL FACTOR OF NON-HODGKIN'S LYMPHOMA

Moscow Medial Academy of I. M. Sechevov

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is an important etiological factor of chronic hepatitis C, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The question of association between HVC and B-cell non-Hodgkin's lymphoma (B-NHL) is widely discussed during last years. Epidemiological data show that chronically HCV-infected individuals are at risk of B-NHL development approximately five times more than non-infected ones. According to the recent data HCV is not only hepato- but lymphotropic virus able to reproduce in mononuclear cells of peripheral blood. Chronic viral stimulation of B-cells may lead to increased proliferation and, finally, malignant transformation of these cells. Proposed literature review is dedicated to molecular biology of lymphoproliferative disorders in chronic HCV infection.

Key words: hepatitis C virus, non-Hodgkin's lymphoma.

К. Д. Никитин

ВИРУС ГЕПАТИТА С КАК ВОЗМОЖНЫЙ ЭТИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ

Московская Медицинская Академия им. И. М. Сеченова

РЕЗЮМЕ

Вирус гепатита С (HCV) — важнейший этиологический фактор развития хронического гепатита С, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. В последние годы было предположено, что HCV также может быть причиной развития части случаев В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-НХЛ): эпидемиологические исследования подтвердили, что лица, хронически инфицированные HCV, имеют риск развития В-НХЛ примерно в 5 раз больший, чем не инфицированные. Согласно современным представлениям, HCV является не только гепато-, но и лимфотропным вирусом, способным репродуцироваться в мононуклеарных клетках периферической крови. Хроническая вирусная стимуляция В-лимфоцитов ведет к их пролиферации и может оканчиваться злокачественной трансформацией и развитием В-НХЛ. Предлагаемый обзор литературы посвящен молекулярно-биологическим механизмам развития лимфопролиферативных заболеваний при хронической HCV-инфекции.

Ключевые слова: вирус гепатита С, неходжкинская лимфома.

Неходжкинская лимфома (НХЛ) — злокачественная опухоль лимфатической ткани, первично развивающаяся в периферических лимфатических органах. НХЛ представляет собой группу новообразований, отличающихся значительным морфологическим разнообразием, которое определяется происхождением различных типов лимфом из различных лимфатических клеток. Выделяют НХЛ В-клеточного и Т-клеточного происхождения, а также в зависимости от степени

дифференцировки клетки-предшественницы и злокачественности клинического течения. Предложено несколько классификаций, последняя из которых — классификация ВОЗ, опубликованная в 2001 г. [23]. Однако чаще используются более удобные практические классификации Ann Arbor и REAL [2].

Этиология лимфом, как и других новообразований из гемопоэтических клеток, окончательно не расшифрована. Только для одной из разновидностей НХЛ —

эндемической формы лимфомы Беркитта — доказана этиологическая роль вируса Эпштейна-Барр. Обсуждается участие в развитии НХЛ человеческого Т-клеточного лимфотропного вируса I типа и герпес-вируса VI типа. Показано достоверное (в 40–60 раз) увеличение частоты развития НХЛ среди ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом, наркоманов, больных первичными иммунодефицитами (синдромы Вискотта-Олдрича, Чедиака-Хигаши, Клайнфельтера, атаксии-телеангиэктазии), больных, получающих иммуносупрессивную терапию (например, описаны случаи развития НХЛ у больных, получающих иммуносупрессивную терапию после трансплантации костного мозга по поводу других гематологических заболеваний) [3].

В последние годы уделяется значительное внимание вирусу гепатита С (HCV) как возможному этиологическому фактору развития НХЛ, о чем свидетельствует большое число публикаций.

HCV является причиной развития острого гепатита С, в 70–85% случаев переходящего в хронический гепатит С и прогрессирующего в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному. Вирус обладает множеством особенностей, которые помогают ему избежать уничтожения нейтрализующими антителами и иммунными клетками. К этим особенностям относятся высокая частота замен аминокислотных остатков в определенных частях вирусных белков, наличие квазивидов вируса, специфическая функция его белков, направленная против противовирусных механизмов организма хозяина. Анализ генома HCV позволил выделить 6 основных генотипов вируса, каждый из которых имеет от 1 до 3 подтипов [37]. Существуют различия во встречаемости того или иного генотипа в различных географических областях. Так, было показано, что в США и Европе преобладают генотипы 1a и 1b, в то время как генотипы 2a, 2b, 3a, 4a встречаются лишь изредка; генотип 2, по всей видимости, является одним из основных видов вируса в Азии, но также может быть с высокой частотой выявлен в средиземноморских странах и северной Европе; генотип 4a распространен на Среднем Востоке и в Северной Африке [31; 35]. В России, как и в Европе в целом, доминирует генотип 1b, особенно на Дальнем Востоке (до 80–83%), в Центрально-Черноземном и Волго-Вятском регионах. Генотип 1a выявляется в Центральном, Северо-Западном, Волго-Вятском регионах (до 20%), в то время, как на территории Восточной Сибири, Центрально-Черноземном районе и Урале распространенность его до 5%. Генотипы 3a, 2a и 2b в России выявляются редко.

Первое сообщение, привлечшее внимание к ассоциации между HCV и лимфопролиферативными заболеваниями, опубликовано в 1991 г. С. Ferri et al. [13]. Исследователи установили, что среди больных хронической HCV-инфекцией с высокой частотой встречается доброкачественное лимфопролиферативное заболевание — смешанная криоглобулинемия (СК). Клинически СК проявляется криоглобулинемическим синдромом: пурпурой, артралгиями, поражением ряда

органов и систем (криоглобулинемический гломеруло-нефрит, периферическая нейропатия, синдром Рейно) [14; 18]. СК относится к II и III типам криоглобулинемий по классификации J.-C. Brouet (1974). При СК типа II криоглобулины представлены комплексами поликлональных IgG и моноклональных IgM с активностью ревматоидного фактора, при СК типа III — комплексами поликлональных IgG и поликлональных IgM с активностью ревматоидного фактора. В настоящее время СК рассматривается как специфическое проявление хронической HCV-инфекции. Так, в России, по данным Т.М. Игнатовой и соавт., частота выявления СК среди больных с установленным диагнозом хронического гепатита С составила 37% [1]. Показано, что СК с достаточно высокой частотой трансформируется в злокачественную лимфому [7; 17; 19].

Далее было обнаружено, что антитела к HCV с высокой частотой определяются в крови больных НХЛ: С. Ferri et al. в 1994 г. обследовали 50 пациентов с НХЛ и обнаружили у 30% из них антитела к HCV, у 32% — вирусемии HCV [15]. Сравнительное изучение группы здоровых людей и больных лимфогранулематозом показало, что у них антитела к HCV встречаются лишь в 1–3% и 3% случаев соответственно.

В последующем были проведены аналогичные исследования, но полученные результаты оказались крайне противоречивыми (см. таблицу). Широкий разброс данных (от 0 до 37%) может быть обусловлен множеством факторов. Наиболее существенными представляются неодинаковая распространенность HCV в разных регионах мира и неодинаковая подверженность разных этнических групп инфекции HCV (рис. 1), детерминированная неизвестными генетическими факторами.



Рис. 1. Встречаемость HCV-инфекции среди больных В-НХЛ в странах мира

Для окончательного решения вопроса о вирусе гепатита С как факторе риска развития НХЛ К. Matsuo et al. [29] провели мета-анализ 23 исследований, посвященных этому вопросу. В мета-анализ были включены данные 23 работ, объединивших в общей сложности 4049 больных НХЛ и 1813480 человек в качестве контрольной группы, проведенные в 10 странах мира. Отбор исследований проводился в соответствии со строгими критериями, что обеспечило высокую статистическую достоверность мета-анализа: не менее 50 пациентов в исследуемой группе, только когортные

Встречаемость HCV-инфекции среди больных НХЛ (%) [4; 5; 6; 8; 9; 12; 20; 21; 24; 25; 28; 30; 33; 34; 38; 39; 40]

Страны	Показатели
Великобритания, Канада, Ливан, Нидерланды, Словения, США, Шотландия, Мексика	0
Турция	1,4
Франция	1,83
Таиланд	2,3
Германия	4,3
Япония	8,1
Бразилия	9
Саудовская Аравия	21
Румыния	29,5
Швейцария	9
Македония	1
Италия	37

исследования или исследования типа «случай-контроль», использование в качестве группы сравнения больных незлокачественными заболеваниями или здоровых людей, использование для определения инфицированности HCV диагностических тестов 2-го и 3-го поколений. Выявлена сильная положительная ассоциация между хронической HCV-инфекцией и В-НХЛ: *инфицированные вирусом гепатита С лица имеют риск развития В-НХЛ примерно в 5 раз больший, чем не инфицированные*. Отмечен повышенный риск развития у лиц HCV-инфицированных Т-клеточных НХЛ.

Таким образом, установлено участие вируса гепатита С в развитии части случаев НХЛ. Уточняются патогенетические механизмы развития НХЛ при хронической HCV-инфекции.

Согласно современным представлениям, HCV является гепато- и лимфотропным вирусом. А. L. Zignego et al. [42] убедительно продемонстрировали, что при хронической HCV-инфекции вирус обнаруживается в периферических мононуклеарных клетках крови: Т- и В-лимфоцитах, способен реплицироваться в этих клетках. Именно лимфотропностью вируса объясняются многочисленные внепеченочные проявления хронической HCV-инфекции, в том числе СК и В-НХЛ.

Расшифровывается патогенетическая связь между HCV и поражением иммунной системы, приводящая к аутоиммунным и лимфопролиферативным расстройствам. Обсуждается, что персистенция HCV в периферических мононуклеарах (преимущественно в В-клетках) приводит к их хронической стимуляции и поликлональной, а затем и моноклональной пролиферации клеток, продуцирующих IgMκ с активностью ревматоидного фактора, что может привести к злокачественной трансформации и В-клеточной лимфоме.

В последние годы был идентифицирован мембранный протеин CD81 как рецептор В-лимфоцитов для HCV. Это открытие может объяснить, каким образом происходит инфицирование и/или активация В-клеток вирусом, и указывать на патогенетическую связь между HCV и лимфопролиферативными заболеваниями. На поверхности В-лимфоцитов CD81 входит в состав сигнального комплекса, специфического для В-клеток, включающего в себя также CD19, CD21 и интерферон-активируемую молекулу Leu-13 [27]. В этом комплексе CD21 связывает комплемент (C3d), CD19 опосредует внутриклеточное сигнализирование. Leu-13 высоко чувствителен к интерферонам и может участвовать в ответе на вирусную инфекцию. Предполагается, что CD81 участвует в запуске процессов клеточной адгезии и пролиферации.

Было установлено [22; 32], что экспрессирующаяся на поверхности клетки молекула CD81 может взаимодействовать с гликопротеином оболочки HCV, известным как E2, что, собственно, и предполагает его роль как рецептора к HCV. Как минимум 1 из 4 остатков аминокислот в составе внеклеточной петли CD81 необходим для взаимодействия клетки с HCV E2 [16; 20]. Известно, что перекрестное связывание CD19/CD21/CD81/Leu-13-комплекса с использованием антител как к CD19, так и к CD21, приводит к снижению порога активации В-лимфоцитов: клетки становятся способными к активации меньшими концентрациями антигенов, что ведет в конечном счете к их повышенной пролиферации. Подобным образом связывание частиц HCV с CD81-содержащим комплексом может содействовать В-клеточной активации и объясняет связь HCV с лимфопролиферативными заболеваниями.

Недавно была обнаружена пролиферация CD5⁺-популяции В-лимфоцитов при хронической HCV-инфекции [11], которая может приводить к аутоиммунным расстройствам [43]. По некоторым данным, CD5⁺-лимфоциты являются основной мишенью вируса. М. Р. Curry et al. [10] показали пролиферацию CD5⁺-лимфоцитов в печени больных с различными стадиями HCV-инфекции (хроническим гепатитом и циррозом печени) и значительное увеличение экспрессии CD81 на поверхности этих клеток.

Изучались нарушения в генах, являющихся ключевыми в механизме апоптоза [41]. В группе 15 больных с HCV-ассоциированной смешанной криоглобулинемией 86 % из них имели JH/bcl-2 транслокацию, в то время как у HCV-инфицированных больных без СК подобное нарушение было обнаружено лишь в 16 % случаев, а среди страдающих хроническими болезнями печени другой этиологии не встречалось вообще.

Другие исследователи изучали возникновение реаранжировок гена bcl-2 и генов иммуноглобулинов. В группе 44 больных с HCV и СК bcl-2 транслокации были обнаружены в 39 % из них, в то время, как у 59 пациентов с хронической HCV-инфекцией, но без СК bcl-2 транслокации были обнаружены лишь у 12 % из них, а у 50 больных с хронической патологией печени,

не связанной с HCV, bcl-2 транслокации не выявлялись [44].

Эти данные подтверждают версию о многоступенчатом механизме патогенного действия HCV, включающем в себя стимуляцию клональной пролиферации В-лимфоцитов и блокирование апоптоза, что ведет к развитию НХЛ (рис. 2).

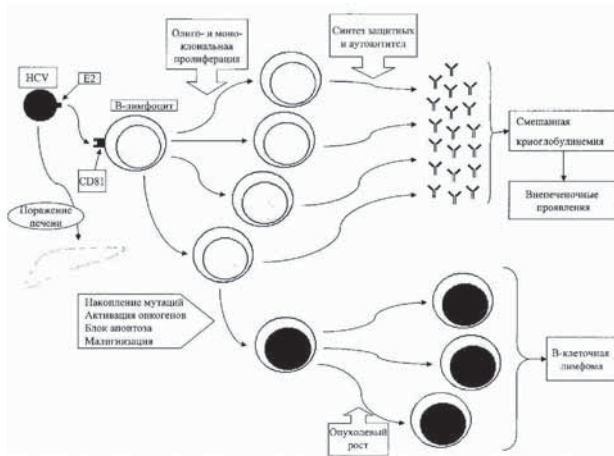


Рис. 2. Патогенез поражения системы крови при хроническом гепатите С

Показано, что более высокая частота развития НХЛ ассоциирована с определенным генотипом HCV и HLA-антигенами. Silvestri et al. [36], выявив среди 470 больных НХЛ 42 больных с HCV-Ab, провели генотипирование HCV-RNA у 31 из них. Было обнаружено выраженное превалирование генотипа 2ас (48,4 %). В контрольной группе (здоровые доноры крови и больные хроническими заболеваниями печени без HCV-Ab) наиболее часто встречался генотип 1b (64 %), что совпадает с аналогичными данными по Италии в целом (60 %) [31]. Остальные генотипы при этом встречались с частотой менее 10 % каждый. Это свидетельствует, что HCV действительно может являться фактором или кофактором, ведущим к развитию НХЛ, и реализуется это явление на уровне взаимодействия геномов вируса и инфицированного человека, причем наиболее опасен генотип 2ас.

Исследование, проведенное группой итальянских специалистов, выявило значительную предрасположенность к развитию HCV-ассоциированных НХЛ у больных с определенным набором HLA-антигенов: риск развития НХЛ значительно возрастает у HCV-инфицированных носителей антигенов HLA-B8 и HLA-DR3, более того, было посчитано, что риск развития СК заметно выше у носителей обоих антигенов одновременно [26]. Основываясь на этих данных, можно объяснить столь высокую частоту HCV-ассоциированных НХЛ в определенных географических регионах (в частности, Италии): очевидно, генотип жителей именно этих областей наиболее предрасположен к развитию НХЛ вследствие неизвестных факторов.

При хронической HCV-инфекции из всего многообразия злокачественных лимфом наиболее часто развивается определенный тип опухоли. Более 75 % лимфом при HCV происходят из В-лимфоцитов (В-НХЛ) и относятся к лимфомам низкой или средней степени злокачественности. Чаще при хронической HCV-инфекции встречаются диффузные крупноклеточные В-НХЛ [25]. Имеются данные, что некоторые виды лимфом встречаются особенно часто: лимфоцитоплазматическая лимфома/иммуноцитома, моноцитоплазматическая лимфома, диффузная крупноклеточная лимфома. Предполагается связь между HCV и лимфомой мукоза-ассоциированной лимфоидной ткани (МАЛТ-лимфомой). Ряд исследований свидетельствует, что наиболее часто встречающейся при HCV-инфекции лимфомой является лимфоцитоплазматическая лимфома/иммуноцитома [36; 40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные данные позволяют с высокой степенью уверенности говорить о вирусе гепатита С как об одном из этиологических факторов, способных приводить к развитию неходжкинских лимфом. Многочисленные исследования в значительной степени расшифровали патогенез злокачественного перерождения лимфоидной ткани под действием HCV в связи с тем, что HCV способен инфицировать не только гепатоциты, но и лимфоциты. Хроническая вирусная стимуляция ведет к пролиферации лимфоцитов и синтезу защитных антител. Со временем защитная реакция переходит в патологическую с развитием доброкачественного лимфопролиферативного заболевания — смешанной криоглобулинемии, которая в дальнейшем может перейти в злокачественное, а именно в НХЛ.

Исходя из этих представлений, целесообразным может быть добавление в схемы лечения НХЛ у HCV-инфицированных больных противовирусных препаратов. Тем не менее необходимы дальнейшие, более крупные исследования для определения истинной способности HCV вызывать НХЛ. Более детальное изучение патогенеза лимфопролиферативных расстройств при хронической HCV-инфекции позволит глубже понять интимные механизмы канцерогенеза и повысить эффективность лечения НХЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апросина З. Г., Игнатова Т. М., Козловская Л. В. и др. Хронический вирусный гепатит. — М.: Медицина, 2002.
2. Поддубная И. В., Дёмина Е. А. Диагностика и определение распространенности (стадирование) неходжкинских лимфом // Практическая онкология. — 2004. — № 3. — С. 176–184.
3. Хансон К. П., Имянитов Е. Н. Эпидемиология и биология неходжкинских лимфом // Практическая онкология. — 2004. — № 3. — С. 163–167.
4. Angello V., Chung R., Keplan L. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia // N Engl J Med. — 1992. — 327. — P. 1490–1495.

5. *Brind A. M., Watson J. P., Burt A. et al.* Non-Hodgkin's lymphoma and hepatitis C virus infection // *Leuk Lymphoma*. — 1996. — 21(1-2). — P. 127–130.
6. *Chindamo MC, Spector N, Segadas JA et al.* Prevalence of hepatitis C infection in patients with non-Hodgkin's lymphomas // *Oncol Rep*. — 2002. — 9(3). — P. 657–659.
7. *Civita L., Zignego A., Monti M. et al.* Mixed cryoglobulinemia as a possible preneoplastic disorder // *Arth Rheum*. 1995. — Vol. 38, No. 12. — P. 1859–1860.
8. *Collier J., Zanke B., Moore M. et al.* No Association Between Hepatitis C and B-Cell Lymphoma // *Hepatology*. — 1999. — 29. — P. 1259–1261.
9. *Cucuianu A., Patiu M., Duma M. et al.* Hepatitis B and C virus infection in Romanian non-Hodgkin's lymphoma patients // *Br J Haematol*. — 1999. — 107(2). — P. 353–356.
10. *Curry M. P., Golden-Mason L., Doherty D. G. et al.* Expansion of innate CDS(pos) B cells expressing high levels of CD81 in hepatitis C virus infected liver // *J Hepatol*. — 2003. — 38(5). — P. 642–650.
11. *Curry M. P., Golden-Mason L., Nolan N. et al.* Expansion of peripheral blood CD5+ B cells is associated with mild disease in chronic hepatitis C virus infection // *J Hepatol*. — 2000. — 32. — P. 121–125.
12. *Ellenrieder V., Weidenbach H., Frickhofen N. et al.* HCV and HGV in B-cell non-Hodgkin's lymphoma // *Journal of Hepatology*. — 1998. — 28. — P. 34–39.
13. *Ferri C., Greco F., Longombardo G. et al.* Antibodies to hepatitis C virus in patients with mixed cryoglobulinemia // 1991. — 34. — P. 1606–1610.
14. *Ferri C., La Civita L., Longombardo G. et al.* Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinaemia (review) // *Eur J Clin Invest*. — 1993. — 23. — P. 399–405.
15. *Ferri C., Caracciolo F., Zignego A. L. et al.* Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma // *British Journal of Haematology*. — 1994. — 88. — P. 392–394.
16. *Flint M., Maidens C., Loomis-Price L. D. et al.* Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81 // *J Virol*. — 1999. — 73. — P. 6235–6244.
17. *Gharagozloo S., Khoshnoodi J., Shokri F.* Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia, multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia // *Pathology Oncology Research*. — 2001. — Vol. 7, No 2. — P. 135–139.
18. *Gorevic P. D., Kassab H. J., Levo Y. et al.* Mixed cryoglobulinemia: clinical aspects and longterm follow-up of 40 patients // *Am J Med*. — 1980. — 69. — P. 287–308.
19. *Gorevic PD, Frangione B.* Mixed cryoglobulinemia crossreactive idiotypes: implication for relationship of MC to rheumatic and lymphoproliferative diseases // *Semin Hematol*. — 1991. — 28. — P. 79–94.
20. *Harakati M. S., Abualkhair O. A., Al-Knawy B. A.* Hepatitis C Virus infection in Saudi Arab patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma // *Saudi Med J*. — 2000. — 21(8). — P. 755–758.
21. *Hausfater P., Cacoub P., Sterkers Y. et al.* Hepatitis C virus infection and lymphoproliferative diseases: prospective study on 1,576 patients in France // *Am J Hematol*. — 2001. — 67(3). — P. 168–171.
22. *Higginbottom A., Quinn E. R., Kuo C. C. et al.* Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 // *J Virol*. — 2000. — 74. — 3642–3649.
23. *Jaffe E. S., Harris N. L., Stein H., Vardiman J. W., eds.* WHO Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. — Lyon: LARC Press, 2001. — 352 p.
24. *Kaya H., Polat M. F., Erdem F., Gundogdu M.* Prevalence of hepatitis C virus and hepatitis G virus in patients with non-Hodgkin's lymphoma // *Clin Lab Haematol*. — 2002. — 24(2). — P. 107–110.
25. *Kuniyoshi M., Nakamuta M., Sakai H. et al.* Prevalence of hepatitis B or C virus infections in patients with non-Hodgkin's lymphoma // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. — 2001. — 16. — P. 215–219.
26. *Lenzi M., Frisoni M., Mantovani V. et al.* Haplotype HLA-B8-DR3 confers susceptibility to hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia // *Blood*. — 1998. — Vol. 91, No 6. — P. 2062–2066.
27. *Levy S., Todd S. C., Maecker H. T.* CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system // *Annu Rev Immunol*. — 1998. — 16. — P. 89–106.
28. *Markovic S., Drozina G., Vovk M., Fidler-Jenko M.* Reactivation of hepatitis B but not hepatitis C in patients with malignant lymphoma and immunosuppressive therapy. A prospective study in 305 patients // *Hepatogastroenterology*. — 1999. — 46(29). — P. 2925–2930.
29. *Matsuo K., Kusano A., Sugumar A., Tajima K., Mueller N. E.* Effect of hepatitis C virus infection on the risk of non-Hodgkin's lymphoma: A meta-analysis of epidemiological studies // *Cancer Sci*. — 2004. — Vol. 95, No 9. — P. 745–752.
30. *McColl M. D., Singer I. O., Tait R. C. et al.* The role of hepatitis C virus in the aetiology of non-Hodgkin's lymphoma - a regional association? // *Leuk Lymphoma*. — 1997. — 26(1-2). — P. 127–130.
31. *Nousbaum J. B., Pol S., Nalpas B. et al.* Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy // *Ann Intern Med*. — 1995. — 122. — P. 161–168.
32. *Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S. et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81 // *Science*. — 1998. — 282. — P. 938–941.
33. *Rabkin C. S., Tess B. H., Christiansen R. E. et al.* Prospective study of hepatitis C viral infection as a risk factor for subsequent B-cell neoplasia // *Blood*. — 2002. — 99. — P. 4240–4242.
34. *Salem Z., Nuwayri-Salti N., Ramlawi F., Ramia S.* Hepatitis C virus infection in Lebanese patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma // *Eur J Epidemiol*. — 2003. — 18(3). — P. 251–253.
35. *Schrüter M., Zyllner B., Schöfer P. et al.* Epidemiological Dynamics of Hepatitis C Virus among

747 German Individuals: New Subtypes on the Advance // J Clin Microbiol. — 2002. — 40(5). — P. 1866–1868.

36. *Silvestri F, Pipan C, Barillari G et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection in patients with lymphoproliferative disorders // Blood. — 1996. — 87(10). — P. 4296–4301.

37. *Simmonds P, Holmes E. C., Cha T. A. et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region // J Gen Virol. — 1993. — 74. — P. 2391–2399.

38. *Thalen D. J., Raemakers J., Galama J., Cooreman M.P.* Absence of hepatitis C virus infection in non-Hodgkin's lymphoma // Br J Of Haem. — 1997. — 96. — P. 880–881.

39. *Udomsakdi-Auewarakul C., Auewarakul P., Sukpanichnant S., Muangsup W.* Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin lymphoma in Thailand // Blood. — 2000. — Vol. 95, No. 11. — P. 3640–3641.

40. *Valissa D., Berte R., Rocca A. et al.* Association between hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphoma, and effects of viral infection on histological subtype and

clinical course // Am J Med. — 1999. — 106. — P. 556–560.

41. *Y. Kitay-Cohen, A. Amiel, N. Hilzenrat et al.* Bcl-2 rearrangement in patients with chronic hepatitis C associated with essential mixed cryoglobulinemia type II // Blood. — 2000. — Vol. 96, No. 8. — P. 2910–2912.

42. *Zignego A.L., Macchia D., Monti M. et al.* Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus // Journal of Hepatology. — 1992. — 15. — P. 382–386.

43. *Zuckerman E., Slobodin G., Kessel A. et al.* Peripheral B-cell CDS expansion and CD81 overexpression and their association with disease severity and autoimmune markers in chronic hepatitis C virus infection // Clin Exp Immunol. — 2002. — 128. — P. 353–358.

44. *Zuckerman E., Zuckerman T., Sahar D. et al.* bcl-2 and immunoglobulin gene rearrangement in patients with hepatitis C virus infection // Br J Haematol. — 2001. — 112(2). — P. 364–369.

Поступила 23.01.2006.

УДК 616.-65-006.6-074:547.96

*T. P. Ryabykh¹, T. V. Osipova¹, E. I. Dementieva², E. N. Savvateeva², E. V. Konovalova²,
Z. A. Sokolova¹, A. Yu. Rubina², A. Yu. Baryshnikov¹, A. S. Zasedatelev²*

BIOCHIP-BASED TEST-SYSTEM FOR SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETERMINATION OF PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN (TOTAL AND FREE FORMS) IN BLOOD SERUM

¹*N. N. Blokhin Cancer Research Center RAMS, Moscow*
²*Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*

ABSTRACT

Prostate-specific antigen (PSA) is elevated in the blood of men with prostate cancer, so it is usable for early detection of this cancer. The use of two PSA forms: total (PSAt) and free (PSAf) enhances specificity of PSA test. Biochip technology opens up the new possibilities for this tumor marker application to cancer screening. So the goal of the investigation was the development of the biochip-based test-system for simultaneous determination of two PSA forms (PSAt and PSAf) in human serum.

Gel-based microchips with immobilized monoclonal antibodies against two forms of tumor antigen were manufactured in Biochip center of EIMB, RAS. PSAt and PSAf concentrations were determined in 'sandwich' immunoassay with fluorescence detection.

Biochip-based test-system for PSAt and PSAf had reasonable analytical performance characteristics. Standard curves obtained in different experiments for PSAt and PSAf had the good reproducibility, coefficients of variation (CV) $\leq 11\%$. The lower limit of detection of the test-system for PSAt and PSAf was 0.1 ng/ml. "Recovery"-test demonstrated that difference of measured concentration from the design one was from 5 to 9 % for PSAt and from 2 to 9 % for PSAf. No cross-reactivity was observed between PSA and the other tumor markers: alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen and cancer antigens CA 19-9, CA 15-3, CA 125.

New biochip-based test-system was examined with the use of clinical material, including sera of cancer patients and healthy donors. It was found, that the levels of PSAt and PSAf in sera of healthy donors did not exceed the cut-off levels: 4 ng/ml and 1.1 ng/ml, respectively. Correlation coefficients for concentrations of PSAt and PSAf in sera of patients with prostate cancer determined in biochip-based test-system and in system Roche Diagnostics were ≥ 0.99 ($p < 0.001$); in biochip-based test-system and in system CanAg - ≥ 0.99 ($p < 0.01$) also.

Thus the laboratory variant of the new biochip-based test-system for PSAt and PSAf was developed. In the future the new system may be used for prostate cancer diagnostics in the group of high risk (men older than 50).

Key words: Protein biochip, cancer diagnostics, prostate cancer, PSA, PSAt, PSAf.

*T. П. Рябых¹, Т. В. Осипова¹, Е. И. Дементьева², Е. Н. Савватеева², Е. В. Коновалова²,
З. А. Соколова¹, А. Ю. Рубина², А. Ю. Барышников¹, А. С. Заседателев²*

ТЕСТ-СИСТЕМА В ФОРМАТЕ БИОЧИПА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ И СВОБОДНОЙ ФОРМ ПРОСТАТА-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

¹*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*
²*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва*

РЕЗЮМЕ

Простатический специфический антиген (ПСА) относится к наиболее эффективным маркерам рака предстательной железы. Применение в диагностике РПЖ 2 форм этого антигена — общей и свободной (ПСАобщ

и ПСАсв) — значительно увеличивает специфичность ПСА-теста. Технология биочипов открывает новые возможности применения этого маркера для скрининга РПЖ. Целью исследования была разработка тест-системы на основе биочипов (изготовлены в ИМБ РАН) для одновременного количественного определения 2 форм ПСА.

Тест-система на основе биочипа на 2 формы ПСА имела удовлетворительные аналитические характеристики. Калибровочные кривые на ПСАобщ и ПСАсв были хорошо воспроизводимы в различных экспериментах, коэффициенты вариации $\leq 11\%$. Аналитическая чувствительность тест-системы как для ПСАобщ, так и для ПСАсв составляла 0,1 нг/мл. Тест на "открытие" показал, что отличие измеряемой концентрации от расчетной составило от 5 до 9 % для ПСАобщ и от 2 до 9 % для ПСАсв. Проверка тест-системы на специфичность показала отсутствие перекрестной реактивности с другими опухолеассоциированными антигенами: АФП, РЭА, и раковыми антигенами СА 19-9, СА 15-3 и СА 125.

Тест-система на биочипе была апробирована на клиническом материале, включающем сыворотки онкологических больных и здоровых доноров. Уровни ПСАобщ и ПСАсв в сыворотках здоровых доноров не превышали общепринятых пороговых уровней: 4 и 1,1 нг/мл соответственно. Коэффициенты корреляции уровней ПСАобщ и ПСАсв в сыворотках больных РПЖ, измеренных на биочипе и в тест-системе Roche Diagnostics, составили $\geq 0,99$, ($p < 0,001$); измеренных на биочипе и в тест-системе CanAg — также $\geq 0,99$, ($p < 0,01$).

Таким образом, разработан лабораторный вариант новой тест-системы в формате биочипа для одновременного определения 2 форм ПСА. В будущем новая тест-система может быть использована для ранней диагностики и скрининга РПЖ в группах высокого онкологического риска (мужчины старше 50 лет).

Ключевые слова: белковый микрочип, диагностика рака, рак простаты, ПСА, ПСАобщ, ПСАсв.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективная диагностика — одна из ключевых проблем онкологии и залог успешного лечения рака.

Современные достижения в изучении молекулярных механизмов развития злокачественного процесса способствовали возникновению новых подходов к диагностике рака и созданию принципиально новых тест-систем [10]. Задача диагностики нового поколения — учет и точное количественное измерение широкого спектра биомаркеров, синтезирующихся в процессе развития опухоли. Полный анализ этой информации позволит с высокой чувствительностью диагностировать ранние стадии опухолевого процесса.

На протяжении многих лет в диагностических целях широко используются иммунохимические маркеры, среди которых основное место занимают опухолеассоциированные антигены, определяемые в сыворотке крови. Эти маркеры в основном используются в прогностических целях, их применение для диагностики ранних стадий опухолевого процесса ограничено. Показано, что использование комбинаций опухолевых маркеров способствует повышению эффективности диагностики злокачественных новообразований [7; 8; 15; 16]. На сегодняшний день одновременное определение в одном образце сыворотки крови нескольких онкомаркеров с помощью существующих коммерческих диагностикумов представляет значительные трудности.

Разработка множественных (мультиплексных) диагностических тест-систем, включающих несколько (в перспективе — сотни и тысячи) потенциальных маркеров, — основная задача диагностики будущего. Именно эту задачу помогает решить возникающая на рубеже веков технология биологических микрочипов.

Микрочип — это массив индивидуальных микро-ячеек, содержащих различные зонды (ДНК, РНК, бел-

ки, антитела и др.) для проведения химических, иммунологических или ферментативных реакций. Основное преимущество микрочипа перед традиционными методами — возможность одновременного анализа образца по многим параметрам с использованием минимальных количеств анализируемого материала и дорогостоящих реагентов.

Наиболее широкое распространение получили ДНК-микрочипы с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами [11], которые успешно применяются в фундаментальной науке и медицине.

Разработка белковых микрочипов представляет собой важную и гораздо более трудно решаемую задачу, поскольку белки, реализующие важнейшие функции клетки, являются более сложными и лабильными молекулами, чем ДНК. Особую проблему представляет разработка белковых чипов на основе моноклональных антител для иммунометрического анализа опухолевых маркеров. Основная трудность решения этой задачи состоит в подборе таких условий проведения иммуноанализа, которые были бы одинаково оптимальны для всех маркеров, объединяемых на чипе.

В Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН) разработана технология микрочипов на основе трехмерных гелевых элементов, содержащих иммобилизованные белки [1; 3; 12; 13]. Трехмерная структура геля повышает емкость ячеек по сравнению с традиционно применяемым в чипах двумерным слоем, увеличивая чувствительность анализа, а также обеспечивает окружение иммобилизованных соединений, позволяющее сохранять белки в нативном состоянии.

С возникновением отечественной технологии белковых микрочипов появилась возможность начать раз-

работки диагностической тест-системы в формате биочипа для одновременного количественного определения сразу нескольких опухолевых маркеров. Создание такой системы в перспективе может привести к существенным изменениям в диагностике рака с помощью белковых маркеров.

Первым этапом на пути создания диагностической тест-системы в формате биочипа на несколько опухолевых маркеров была разработка системы для одновременного количественного анализа 2 форм простата-специфического антигена (ПСА) — главного маркера рака предстательной железы. ПСА широко применяется в клинических исследованиях не только для мониторинга течения заболевания, оценки проводимого лечения, прогнозирования опухолевого процесса, но и для ранней диагностики и скрининга на рак предстательной железы [2; 9]. Одновременное использование 2 форм ПСА: общей (ПСАобщ) и свободной (ПСАсв) увеличивает специфичность ПСА-теста [9]. Технология биочипов открывает новые возможности для одновременного определения 2 форм ПСА (а в перспективе — и других маркеров) для ранней диагностики рака простаты.

Ранее нами показана принципиальная возможность количественного анализа опухолевых маркеров в условиях гелевых микрочипов [1; 6].

Целью настоящего исследования была разработка диагностической тест-системы в формате биочипа для одновременного количественного определения 2 форм ПСА (ПСАобщ и ПСАсв) как первого этапа на пути создания биочипа для определения нескольких опухолевых маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

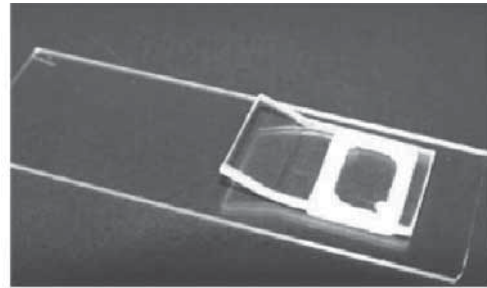
Трехмерные микрочипы на основе гидрогелей

В работе использованы микрочипы на основе гидрогелей с иммобилизованными моноклональными антителами к 2 формам ПСА, разработанные в ИМБ РАН. Биочип представляет собой матрицу трехмерных полусферических гелевых элементов, отделенных друг от друга гидрофобной поверхностью предметного стекла (рис. 1). Каждая ячейка матрицы, представляющая собой индивидуальный микроконтейнер объемом 1 нанолитр или менее, которую можно рассматривать как миниатюрную пробирку или лунку планшета, может быть использована для проведения различных реакций.

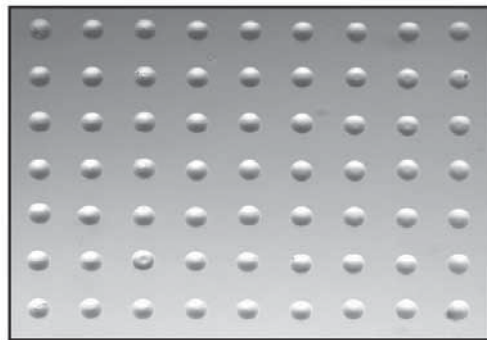
Антигены, моноклональные антитела и образцы сывороток

Антигены: ПСА, раковоэмбриональный антиген (РЭА), альфа-фетопротеин (АФП) и раковые антигены СА 19-9, СА 15-3 и СА 125 получены на фирме Хема-Медика (Россия). Готовые растворы стандартов ПСА приобретены на фирме CanAg (Швеция).

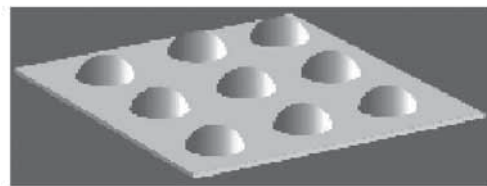
Моноклональные антитела, специфические к ПСА, предоставлены Лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ГУ Онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН (РОНЦ РАМН) [4; 5] или приобретены на фирме CanAg (Швеция).



а



б



в

Рис. 1. Структура биочипов на основе гидрогелей: а — общий вид; б — фото; в — увеличенное изображение

Диагностические наборы для определения общей или свободной форм ПСА. В работе использованы диагностические наборы фирмы CanAg (Швеция).

Верифицированные образцы сывороток любезно предоставлены Лабораторией клинической иммунологии и Урологическим отделением ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Концентрация антигена в сыворотках определена с помощью автоматизированной электрохемилюминесцентной тест-системы ELECSYS фирмы Roche Diagnostics (Германия).

Иммуноанализ на биочипе

В работе использован двухстадийный сэндвич-вариант иммуноанализа. Были получены микрочипы с иммобилизованными моноклональными антителами, специфичными к ПСАобщ и ПСАсв. На микрочипы наносили раствор антигена или образец сыворотки крови и после этого — вторые моноклональные антитела, специфичные к ПСА, меченные флюоресцентным красителем (Cy 5). Флюоресцентные сигналы регистрировали с помощью анализатора биочипов на основе CCD камеры, сопряженного с компьютерной системой, со специальным программным обеспечением (Биочип ИМБ, Россия).

Концентрации 2 форм ПСА в образцах сыворотки определяли по соответствующим калибровочным кривым.

Чувствительность

Аналитическую чувствительность тест-системы определяли как концентрацию антигена, соответствующую средней (12-кратно определенной) флуоресценции нулевого стандарта плюс 2 стандартных отклонения (средняя величина + 2SD).

Биологическую чувствительность тест-системы в формате биочипа определяли, используя сыворотки крови мужчин с низкими концентрациями ПСА [14]. Биологический предел обнаружения в иммуноанализе на микрочипе был рассчитан как первое среднее значение концентрации 3-кратно измеренного образца сыворотки, превышающее на 2SD доверительный интервал многократно определенного нулевого калибратора ($p < 0,05$).

Специфичность

Тест на специфичность ставили в 2 вариантах. В первом, наряду с ПСА в концентрации 30 нг/мл, на чипы наносили и другие опухолевые маркеры: АФП — 100 нг/мл; РЭА — 64 нг/мл; раковые антигены СА 19-9 — 240 ед/мл; СА 15-3 — 240 ед/мл; СА-125 — 400 ед/мл. Во втором варианте в тесте на специфичность использовали сыворотки крови женщин с различными онкологическими заболеваниями с высокими уровнями опухолеассоциированных антигенов: РЭА, — 1340 нг/мл; АФП — 40 нг/мл; и раковых антигенов СА 19-9, — 604 ед/мл; СА 15-3, — 58,7 ед/мл и СА 125, — 658 ед/мл, а также сыворотку крови мужчины с уровнем ПСА 21,2 нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Построение калибровочных кривых

Была изготовлена партия биочипов с иммобилизованными моноклональными антителами к общей и свободной формам ПСА. Антиген ПСА был раститрован в широком диапазоне концентраций, и были выбраны участки калибровочных кривых для ПСАобщ и ПСАсв, характеризующиеся стабильной линейностью. Рабочие диапазоны концентраций составили от 0,3 до 30 нг/мл для ПСАобщ и от 0,3 до 10 нг/мл для ПСАсв соответственно. Типичные калибровочные кривые для ПСАобщ и ПСАсв представлены на рис. 2. Из рисунков видно, что в указанных диапазонах концентраций они имеют характер, близкий к линейному. Известные из литературы верхние границы нормы для ПСАобщ (4 нг/мл) и ПСАсв (1,1 нг/мл) находятся в пределах линейного диапазона калибровочных кривых.

Аналитические характеристики тест-системы в формате биочипа

Проведен анализ *воспроизводимости* калибровочных кривых для ПСАобщ и ПСАсв. Показано, что калибровочные кривые имеют удовлетворительную воспроизводимость: коэффициенты вариации (КВ) для каждой точки калибровочной кривой как в пределах одного эксперимента (*intra-assay*), так и в трех независимых экспериментах (*inter-assay*) не превышали 11 %. Рис. 3. иллюстрирует как *intra-assay*, так и *inter-*

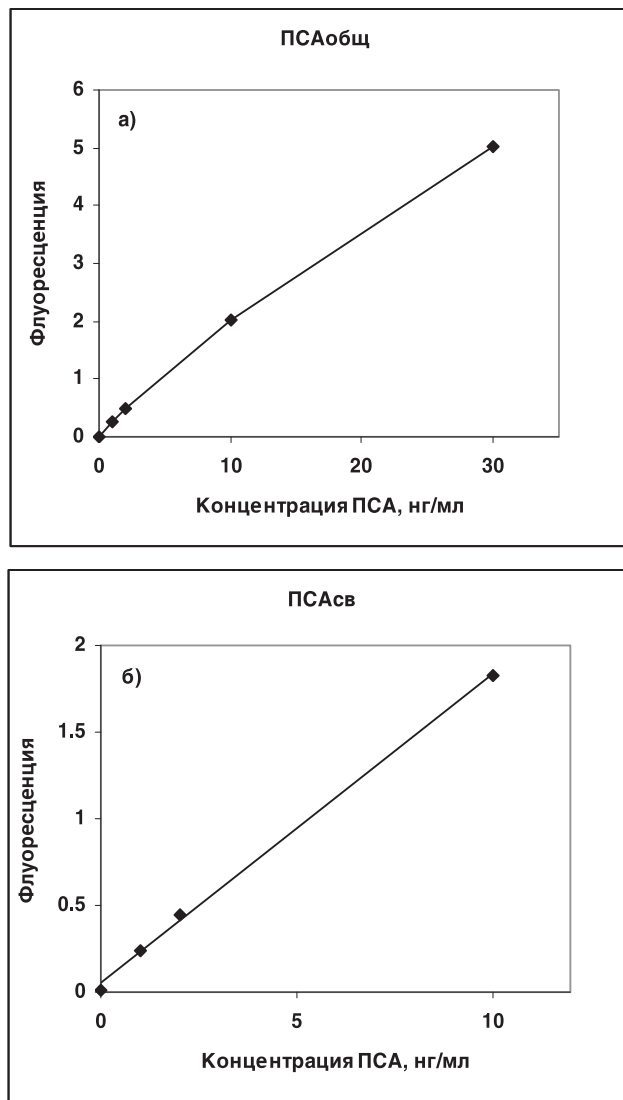


Рис. 2. Типичные калибровочные кривые для ПСАобщ (а) и ПСАсв (б)

assay воспроизводимости калибровочных кривых для ПСАобщ и ПСАсв.

Сыворотки крови человека использовали для оценки *точности* измерений в пределах одного эксперимента. Видно (рис. 4), что уровни ПСАобщ, ПСАсв и %ПСАсв (отношение ПСАсв к ПСАобщ, выраженное в процентах) в сыворотках имеют удовлетворительную воспроизводимость: КВ для ПСАобщ, ПСАсв и %ПСАсв не превышает 8; 15 и 16 % соответственно.

Чувствительность — важная характеристика диагностической тест-системы. Аналитическая чувствительность (нижний предел определения) тест-системы в формате биочипа как для ПСАобщ, так и для ПСАсв составила 0,1 нг/мл, а биологическая чувствительность — 0,4 нг/мл, что соизмеримо с чувствительностью ряда традиционных коммерческих тест-систем.

Надежность тест-системы в формате микрочипа оценивали с помощью тестов на линейность и «открытие».

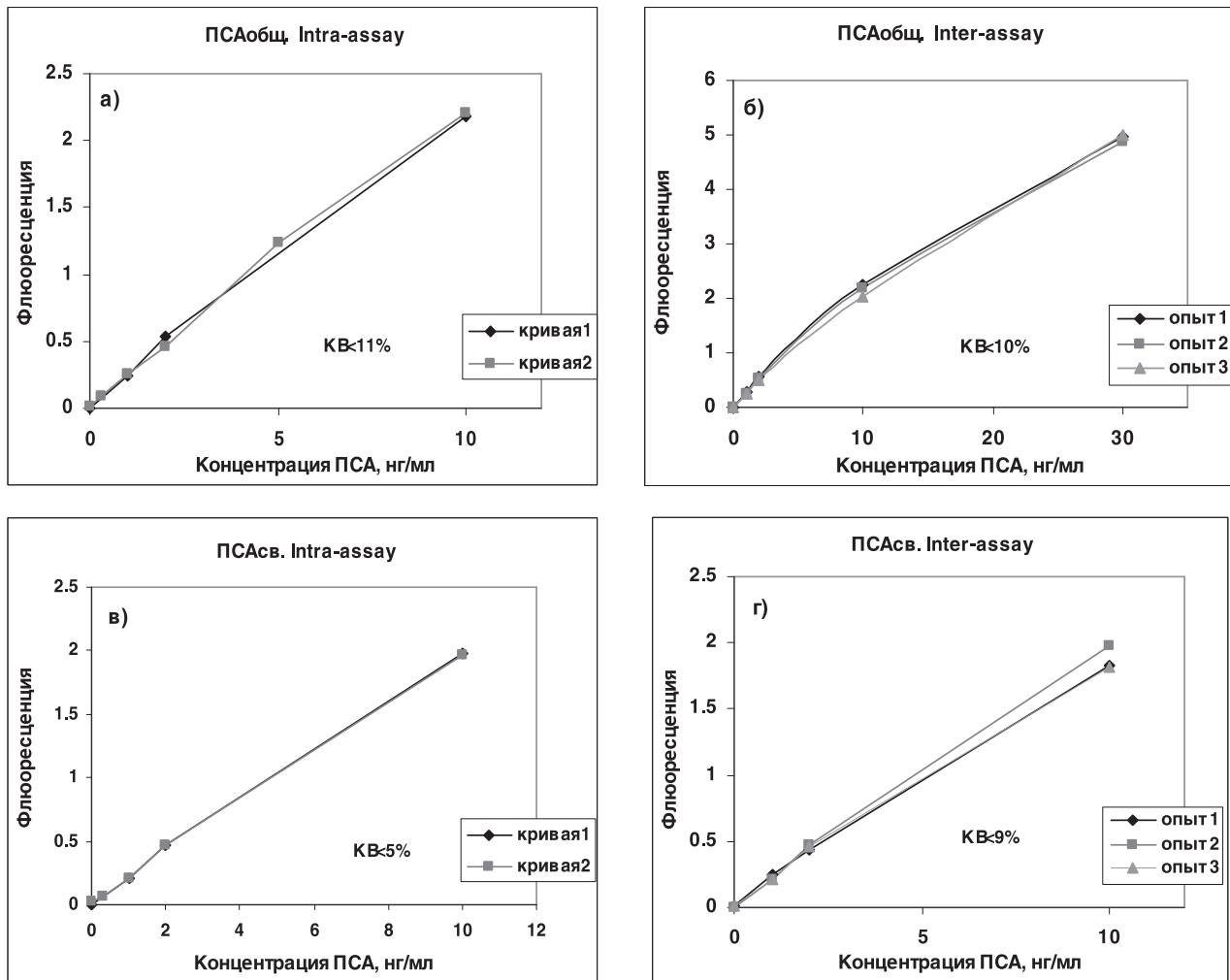


Рис. 3. Воспроизводимость калибровочной кривой для ПСАобщ (а, б) и ПСАсв (в, г): (а, в) в одном эксперименте (intra-assay) и (б, г) в 3 независимых экспериментах (inter-assay), поставленных в пределах 3 нед

Тест на разбавление/линейность. Образец сыворотки крови больного с известным содержанием ПСА (50 нг/мл) последовательно двукратно разбавляли с помощью сыворотки, которая была предварительно промерена на биочипе и не содержала ПСА. Рис. 5 показывает линейный характер кривой, соответствующей разведениям анализируемого образца сыворотки, и ее параллелизм по отношению к калибровочной кривой в интервале концентраций от 0 до 12,5 нг/мл.

Тест на «открытие». Образцы для постановки теста были получены путем добавления сывороток с различными концентрациями ПСАобщ к образцам, содержащим известную концентрацию ПСАобщ (то же самое — для ПСАсв). Сравнивали ожидаемую концентрацию, которая должна была получиться при смешении сывороток с известными концентрациями с реально измеренной на чипе. Отношение измеренной концентрации к ожидаемой, выраженное в процентах, — «процент открытия» — для ПСАобщ составил 91-105 %, для ПСАсв — 102-109 % (табл. 1 и 2).

Результаты проведенных тестов свидетельствуют о достаточной надежности определения антигена в тест-системе в формате биочипа.

Специфичность тест-системы. В обоих вариантах постановки теста на специфичность не наблюдалось перекрестной реактивности между моноклональными антителами, специфичными к ПСА, с такими опухолевыми маркерами, как АФП, РЭА, опухолевыми антигенами СА 19-9, СА 15-3, СА 125. Рис. 6. показывает отсутствие перекрестной реактивности при добавлении различных сывороток, содержащих повышенные концентрации этих опухолеассоциированных антигенов, в тест-систему в формате биочипа для анализа ПСАобщ. Значительный флуоресцентный сигнал наблюдается только при добавлении сыворотки, содержащей ПСА.

Определение уровней ПСАобщ и ПСАсв в сыворотках крови

Новая тест-система в формате биочипа должна была пройти апробацию на клиническом материале, включающем сыворотки крови здоровых доноров и онкологических больных.

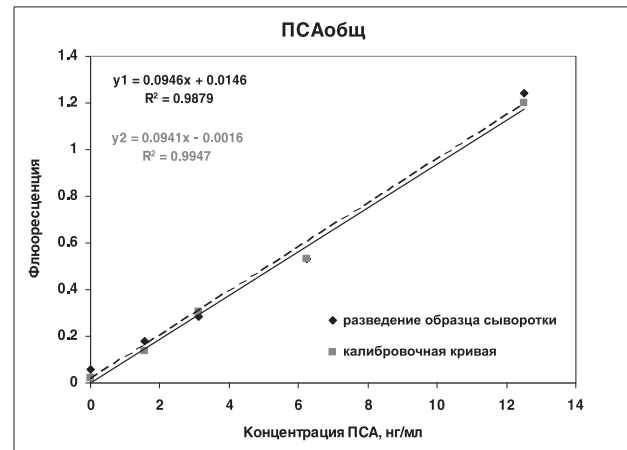
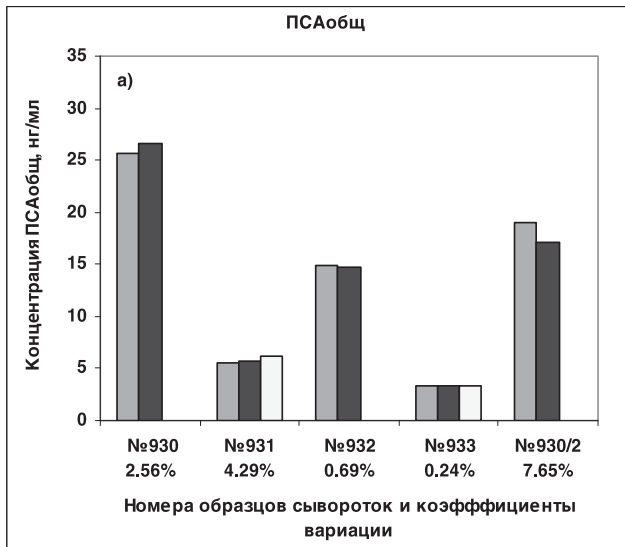


Рис. 5. Тест на линейность для ПСАобщ. Калибровочная кривая и кривая разведения образца сыворотки

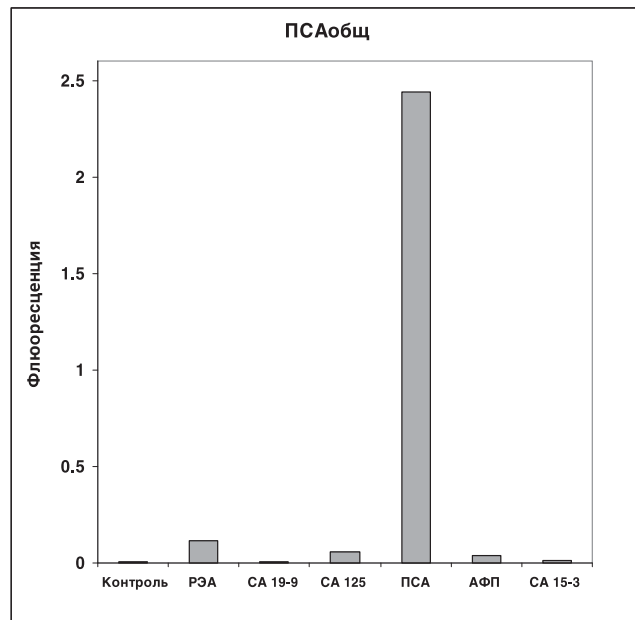
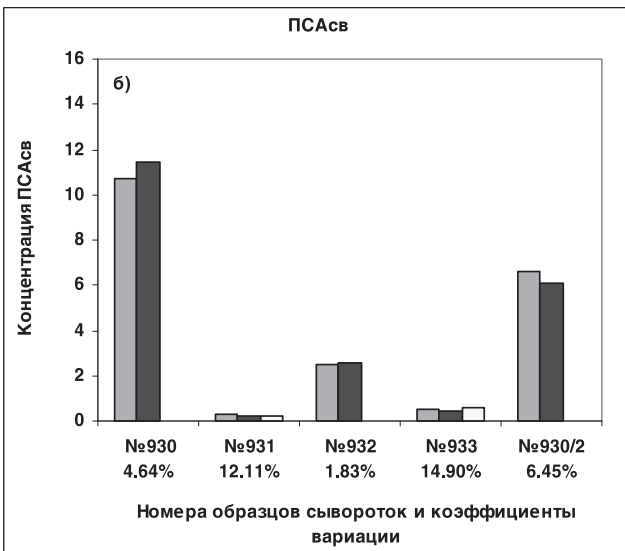


Рис. 6. Специфичность тест-системы на ПСА в формате биочипа. Объяснения в тексте

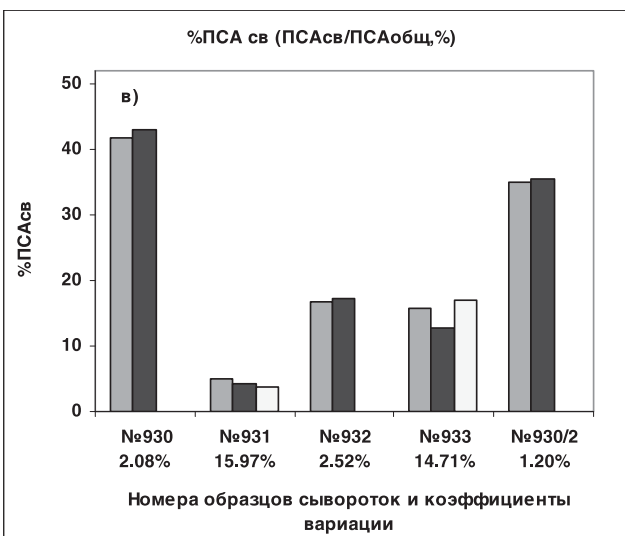


Рис. 4. Воспроизводимость определения уровней ПСАобщ (а), ПСАсв (б) и %ПСАсв (в) в сыворотках крови человека в пределах одного эксперимен

Уровни ПСАобщ и ПСАсв в сыворотках крови здоровых доноров, определенные с помощью биочипов по калибровочным кривым, не превышали верхних границ нормы, известных из литературы: 4 и 1,1 нг/мл соответственно (рис. 7). Средние уровни ПСАобщ и ПСАсв в сыворотках здоровых доноров (мужчин) составляли 0,66 и 0,33 нг/мл соответственно.

Следующим этапом работы было определение на биочипах уровней ПСАобщ и ПСАсв в сыворотках крови больных раком простаты и сравнение с известными и хорошо зарекомендовавшими себя методами. В этих экспериментах использовали верифицированные сыворотки, уровни ПСА в которых предварительно были оценены в традиционных коммерческих тест-системах Roche Diagnostics и CanAg.

Таблица 1

ПСАОбщ. Тест на «открытие»

	Концентрация ПСАОбщ, нг/мл		
	Измеренная	Ожидаемая	% открытия
пул 1	1,18		
пул 2	4,48		
пул 3	19,59		
пул 1+ пул 2	2,97	2,83	105
пул 1+ пул 3	9,47	10,36	91
пул 2+ пул 3	11,92	12,04	99

Таблица 2

ПСАсв. Тест на «открытие»

	Концентрация ПСАсв, нг/мл		
	Измеренная	Ожидаемая	% открытия
пул 1	0,19		
пул 2	0,70		
пул 3	4,46		
пул 1+ пул 2	0,49	0,45	109
пул 1+ пул 3	2,36	2,32	102
пул 2+ пул 3	2,82	2,58	109

На рис. 8. представлены линии регрессии уровней ПСАОбщ (а) и ПСАсв (б), измеренных на чипе и в системе Roche Diagnostics. Видно, что в обоих случаях точки расположены вблизи линий регрессии: величина достоверности аппроксимации (R^2) составляет 0,986

и 0,985 соответственно. Концентрации каждой из форм ПСА, полученные для одних и тех же сывороток в обеих тест-системах, связаны уравнениями линейной регрессии, указанными на рис 8 (а, б). Коэффициенты корреляции уровней ПСАОбщ (рис. 8а) и ПСА св (рис. 8б) в сыворотках больных раком простаты, оце-

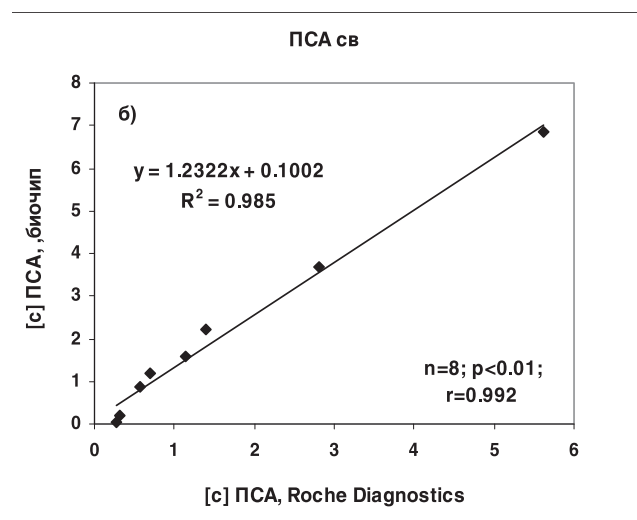
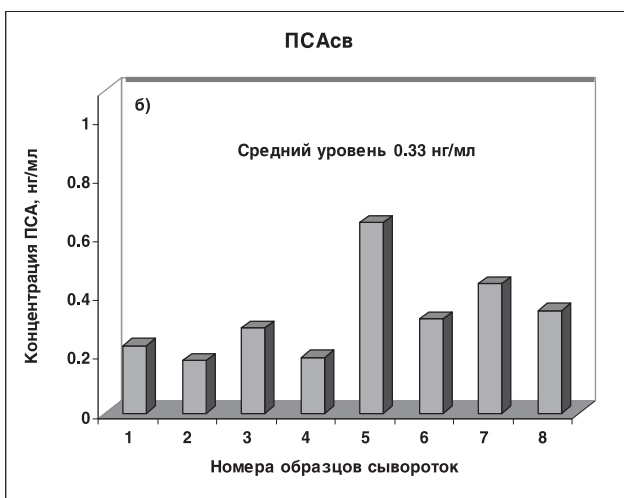
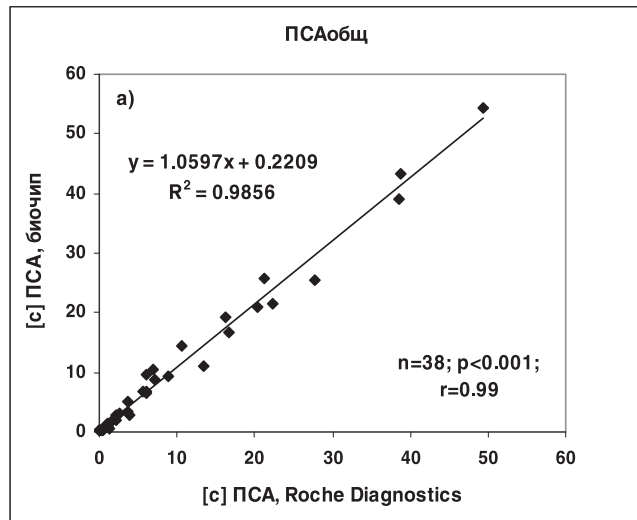
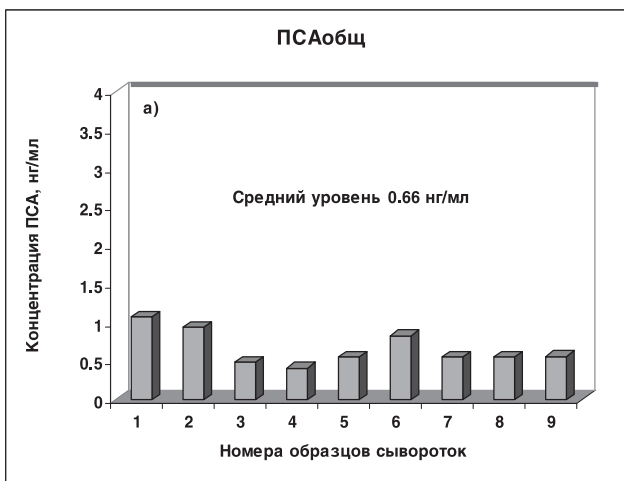


Рис. 7. Определение уровней ПСАОбщ (а) и ПСАсв (б) в сыворотках крови здоровых доноров: жирными линиями обозначены верхние границы нормы для ПСАОбщ и ПСАсв (4 нг/мл и 1,1 нг/мл соответственно)

Рис. 8. Линии регрессии уровней ПСАОбщ (а) и ПСА св (б), определяемых в образцах сывороток больных раком простаты в тест-системе Roche Diagnostics и в тест-системе в формате биочипа

ненные в 2 тест-системах, составляют 0,99 ($p < 0,001$) и 0,992 ($p < 0,01$) соответственно.

На рис. 9 представлены аналогичные данные ПСАобщ и ПСАсв при использовании в качестве референтной системы коммерческой тест-системы CanAg (CanAg PSA EIA и CanAg Free PSA EIA). Уровни ПСАобщ, определенные в 2 тест-системах, связаны уравнением регрессии, указанным на рис 9, а. Для ПСАсв уравнение регрессии приведено на рис. 9, б. Коэффициент корреляции для ПСАобщ составляет 0,994 ($p < 0,01$), а для ПСАсв — 0,99 ($p < 0,01$).

Полученные результаты свидетельствуют, что новая тест-система в формате биочипа для одновременного определения ПСАобщ и ПСАсв в образцах сывороток больных раком предстательной железы позволяет получать результаты, сравнимые с результатами, полученными в таких тест-системах, как Roche Diagnostics и CanAg.

Таким образом, разработан лабораторный вариант диагностической тест-системы в формате биочипа для

одновременного количественного определения общей и свободной форм простата-специфического антигена. Новая тест-система имеет удовлетворительные аналитические характеристики: аналитическую чувствительность — 0,1 нг/мл, биологическую чувствительность — 0,4 нг/мл, хорошую воспроизводимость калибровочных кривых, отсутствие перекрестной реактивности с рядом опухолеассоциированных маркеров и достаточную надежность, оцененную в тестах на линейность и «открытие».

Сравнительный анализ результатов, полученных в одних и тех же образцах сывороток крови, на биочипе и в диагностических тест-системах Roche Diagnostics и CanAg показал высокую степень корреляции полученных данных ($r \geq 0,99$; $p < 0,01$) для обеих форм ПСА.

Таким образом, тест-система на основе биочипа позволяет проводить одновременное количественное определение 2 форм опухолевого маркера (ПСА) в минимальных объемах образца (20 мкл). В перспективе эта тест-система может быть использована для ранней диагностики и скрининга на рак простаты в группе высокого риска (мужчины старше 50 лет) и расширена за счет включения новых маркеров.

Ранее нами была показана [1] принципиальная возможность определения с помощью гелевых микрочипов и других опухолеассоциированных антигенов: АФП (маркера гепатоцеллюлярного рака), РЭА (маркера колоректального рака), раковых антигенов СА 19-9, (маркера рака поджелудочной железы), СА 15-3 (маркера рака молочной железы), СА 125 (маркера рака яичника). Таким образом, технология микрочипов открывает широкие возможности для одновременного анализа образцов сыворотки крови онкологических больных сразу на несколько (в перспективе — на множество) биомаркеров, что может привести к значительному увеличению эффективности диагностики рака.

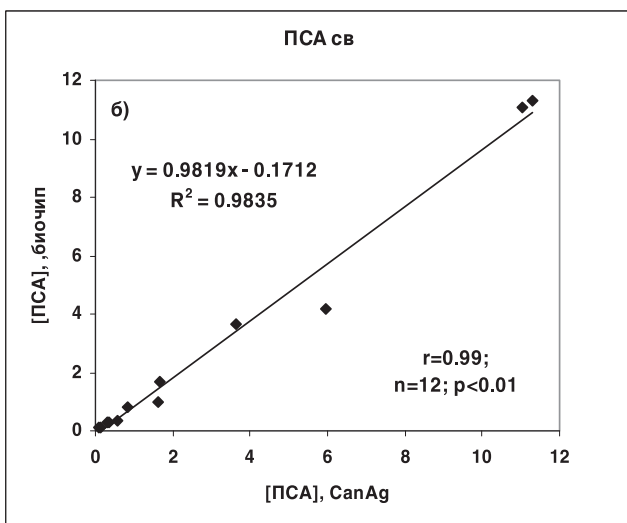
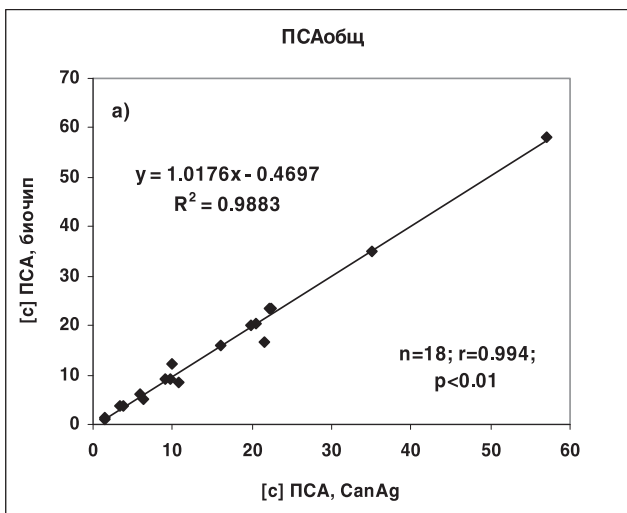


Рис. 9. Линии регрессии уровней ПСАобщ (а) и ПСАсв (б), определяемых в образцах сывороток больных раком простаты в тест-системе CanAg и в тест-системе в формате биочипа

ЛИТЕРАТУРА

1. Дементьева Е. И., Рубина А. Ю., Дарий Е. Л. и др. Применение белковых микрочипов для количественного определения опухолеассоциированных маркеров // ДАН. — 2004. — Т. 395. — С. 542–547.
2. Матвеев Б. П., Бухаркин Б. В., Матвеев В. Б. Рак предстательной железы / Скрининг рака предстательной железы. <http://medi.ru/doc/093105.htm>, 2000. — С. 1–9.
3. Мирзабеков А. Д., Рубина А. Ю., Паньков С. В. Композиция для полимеризационной иммобилизации биологически значимых соединений и способ ее осуществления. Патент WO 03/033539, БИ, 2003, 32.
4. Осипова Т. В., Ленева Н. В., Боровкова Н. Б., Барышников А. Ю. Создание диагностической тест-системы, выявляющей простатический специфический антиген, на основе новых моноклональных антител // Мед. Иммунол., Дни иммунологии в Санкт-Петербурге. — 2001. — Т. 3, № 2. — С. 150–151.
5. Осипова Т. В., Ленева Н. В., Виха Г. В. и др. Набор для количественного определения

общего простатического антигена в сыворотке крови человека методом одностадийного твердофазного иммуноферментного анализа. Патент RU 224006 С2, БИ, 2004, 34.

6. *Осипова Т. В., Рябых Т. П.* Белковые микрочипы для диагностики злокачественных новообразований. Разработка биочипа на простата-специфический антиген // Росс. биотер. журн. — 2003. — Т. 2, № 3. — С. 24–30.

7. *Ando S., Kimura H., Iwai N. et al.* Optimal combination of seven tumour markers in prediction of advanced stage at first examination of patients with non-small cell lung cancer // *Anticancer Res.* — 2001. — Vol. 21. — P. 3085–3092.

8. *Carpelan-Holmstrom M., Louhimo J., Stenman U. N. et al.* CEA, Ca 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers // *Anticancer Res.* — 2002. — Vol. 22(4). — P. 2311–2316.

9. *Catalona W. J., Smith D. S., Ratliff T. L. et al.* Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer // *N. Engl. J. Med.* — 1991. — 324. — P. 1156–1161.

10. *Gander T. R., Brody E. N., Mehler R. E. et al.* Driving forces in cancer diagnostics // *MLO.* — 2003. — 10. — P. 10–20.

11. *Proudnikov D., Timofeev E., Mirzabekov A.* Immobilization of DNA in polyacrilamide gel for the man-

ufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips // *Anal. Biochem.* — 1998. — Vol. 259. — P. 34–41.

12. *Rubina A., Dementieva E., Stomakhin A. et al.* Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications // *BioTechniques.* — 2003. — 34. — P. 1008–1022.

13. *Rubina A. Yu, Pan'kov S. V., Dementieva E. I. et al.* Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production // *Anal. Biochem.* — 2004. — 325. — P. 92–106.

14. *Stamey T., Graves H., Wehner N. et al.* Early detection of residual prostate cancer after radical prostatectomy by an ultrasensitive assay for prostate specific antigen // *J Urol.* — 1993. — 149. — P. 787–792.

15. *Woolas R. P., Xu F. J., Jacobs I. J. et al.* Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer // *J. Natl Cancer Inst.* — 1993. — 3, 85(21). — P. 1748–1751.

16. *Zhang Z., Barnhill S.D., Zhang H. et al.* Combination of multiple serum markers using an artificial neural network to improve specificity in discriminating malignant from benign pelvic masses // *Gynecol Oncol.* — 1999. — Vol. 73, № 1. — P. 56–61.

Поступила 02.05.2006.

УДК 618.14-006.6-091

E. A. Mustafina, M. A. Shabanov, V. V. Barinov, L. I. Bokina, V. P. Kozachenko

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF ENDOMETRIAL CANCER OF II STAGE

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

The research has comprised 109 patients suffering from rare endometrial carcinoma of stage II, who were treated at the Blokhin Russian Cancer Research Center from 1980 till 2000 year. Morphological signs of endometrial cancer with spreading to cervix were studied and analysed. We examined morphological signs of endometrial cancer of stage IIA and IIB which hadn't been studied before (the degree of anaplasia, the depth of neoplasma invasion into stroma of cervix, the lymphovascular invasion into the miometrium and stroma of cervix, the microvessels density in the zone of the greatest invasion, the presence of foci of necrosis in the tumor). Data obtained demonstrate that endometrial cancer of stage II has a number of distinguishing morphological peculiarities characteristic for both IIA and IIB stages.

Key words: endometrial carcinoma, cervix, morphology.

E. A. Мустафина, М. А. Шабанов, В. В. Баринов, Л. И. Бокина, В. П. Козаченко

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАКА ЭНДОМЕТРИЯ II СТАДИИ

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

Материалом для исследования послужили 109 больных с редко встречаемой II стадией рака тела матки (РТМ), проходивших лечение в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина с 1980 по 2000 гг. Изучены и проанализированы морфологические признаки рака эндометрия с распространением на шейку матки. Рассмотрены ранее не изученные морфологические признаки РТМ IIA и IIB стадий (степень анаплазии опухоли, глубина инвазии опухоли в строму шейки матки, лимфоваскулярная инвазия в миометрий и строму шейки матки, плотность микрососудов в зоне наибольшей инвазии, наличие очагов некроза в опухоли). Полученные данные свидетельствуют, что РТМ II стадии имеет ряд отличительных морфологических особенностей, характерных как для IIA, так и для IIB стадий.

Ключевые слова: рак эндометрия, шейка матки, морфология.

ВВЕДЕНИЕ

Рак эндометрия с поражением шейки матки встречается относительно редко и по данным разных авторов составляет от 6,1 до 16,8 % всех случаев неоплазии эндометрия [1; 2; 3; 4; 7; 18; 26].

Согласно системы стадирования FIGO, принятой в 1988 г., II стадия рака эндометрия определяется на основании морфологических данных о распространении опухоли на шейку матки и подразделяется на IIA стадию — вовлечение только эндоцервикальных желез, IIB стадию — поражение стромы шейки матки [6], что соответствует T2AN0M0 и T2BN0M0 стадии по системе TNM (2003 г.).

В настоящее время существует ограниченное количество литературных данных, особенно отечественных, о больных морфо-хирургической II стадией рака

РТМ. Возможно, это происходит из-за редкой встречаемости пациенток на данной стадии заболевания, в связи с чем анализ подобных случаев основан на кооперированных исследованиях ряда клиник.

Несмотря на то, что морфо-хирургическая классификация существует с 1988 г., в литературе только за последнее десятилетие можно проследить разделение II стадии РТМ на IIA и IIB стадии. По данным разных авторов наблюдаются большие колебания в распределении больных раком эндометрия по стадиям: IIA стадия 32-70 %, IIB стадия 30-68 % [7; 9; 14; 20; 22; 23].

По данным, опубликованным FIGO и другими авторами, показано, что переход опухоли на шейку матки ухудшает прогноз в сравнении с заболеванием, ограниченным только телом матки [12; 13; 15; 21].

Хотя согласно литературным данным показатели выживаемости при II стадии РТМ варьируют от 58 до 93 %, существует относительно устоявшееся утверждение о более благоприятном течении заболевания при вовлечении только эндоцервикальных желез, чем при поражении стромы шейки матки [1; 2; 4; 5; 8; 9; 10; 11; 16; 17; 19; 22; 24; 25]. В нескольких работах сообщается о высоких показателях результатов лечения за последние годы [8; 9; 10; 17; 22]. Возможно, это объясняется, тем, что в данных исследованиях участвовали строго отобранные группы больных, прошедших первичное хирургическое стадирование (расширенная экстирпация матки с придатками и цитологическое исследование смывов из брюшной полости), которое исключает неточности в определении распространенности опухолевого процесса, присущее клиническому стадированию, существовавшему до 1988 г.

Несмотря на ряд сообщений о высоких результатах 5-летней выживаемости больных раком эндометрия с переходом на шейку матки, следует отметить, что данный показатель не имеет достаточной тенденции к улучшению. В настоящее время четко не сформулированы клинические и морфологические особенности рака эндометрия с распространением на шейку матки с учетом стадии заболевания (IIA и IIB) и их влияние на отдаленные результаты лечения; также нет единого мнения в отношении принципов терапии больных РТМ IIA и IIB стадий, что послужило поводом для углубленного рассмотрения данной проблемы.

Учитывая, что переход опухоли на шейку матки является следствием неблагоприятных факторов, характеризующих первичную опухоль тела матки [15], да и само распространение неоплазии на шейку матки вносит ряд особенностей в течение заболевания, одной из первостепенных задач является изучение морфологических характеристик рака эндометрия с поражением только эндоцервикальных желез и вращением в строму шейки матки.

В связи с этим впервые проведен детальный анализ сравнительно большого количества больных IIA и IIB стадиями РТМ, сконцентрированных в одной клинике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами изучены и проанализированы морфологические признаки РТМ II стадии в целом и каждой стадии в отдельности (IIA и IIB). Морфологическое исследование гистологических препаратов и верификация диагноза осуществлены 109 больным РТМ, находившимся на обследовании и лечении в отделении гинекологии НИИ КО РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН с 1980 по 2000 г. Для общей морфологической характеристики опухолевой и прилежащих к ней нормальных тканей исследовали гистологические срезы ткани тела и шейки матки с опухолью.

Стадия РТМ определялась в соответствии с международной классификацией FIGO (1988 г.) — IIA и IIB стадии, что соответствует по системе TNM (2003 г.) T2AN0M0 и T2BN0M0 стадиям.

Рассмотрены ранее не изученные морфологические признаки РТМ IIA и IIB стадий (степень анаплазии опухоли, глубина инвазии опухоли в строму шейки матки, лимфоваскулярная инвазия в миометрий и строму шейки матки, плотность микрососудов в зоне наибольшей инвазии, наличие очагов некроза в опухоли).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РТМ с распространением только на эндоцервикальные железы (IIA стадия) определялся практически в 2 раза реже — у 32 больных (29,4 %), чем с поражением стромы (IIB стадия) шейки матки — у 77 пациентов (70,6 %) ($p < 0,05$) (рис. 1).

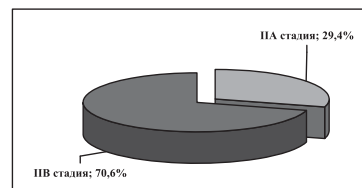


Рис. 1. Распределение больных РТМ II стадии

Для определения гистологического типа опухоли все аденокарциномы эндометрия классифицировали согласно международной гистологической классификации опухолей матки ВОЗ 2-го пересмотра (2003).

В табл. 1 представлены данные распределения больных РТМ с поражением шейки матки с учетом гистологического строения опухоли.

Таблица 1

Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от гистологического строения опухоли

Гистологический тип опухоли	II стадия		IIA стадия		IIB стадия	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Эндометриальная аденокарцинома	65	59,7	25	78,1	40	52
Эндометриоидная аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией	26	23,8	3	9,4	23	29,8
Редкие формы рака тела матки	18	16,5	4	12,5	14	18,2
Всего	109	100	32	100	77	100

У 65 (59,7 %) больных РТМ II стадии была диагностирована эндометриоидная аденокарцинома различной степени дифференцировки, у 26 пациенток (23,8 %) эндометриоидная аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией и у 18 (16,5 %) больных — редкие гистологические формы РТМ, которые включали: светлоклеточную аденокарциному — 8 пациенток (7,3 %), железисто-плоскоклеточный рак — 7 пациенток (6,4 %), серозную папиллярную аденокарциному — 2 пациентки (1,8 %), муцинозную аденокарциному — 1 (0,9 %).

При анализе данных о распределении больных РТМ II стадии с учетом морфологической структуры установлена относительно частая встречаемость редких гистологических форм (светлоклеточная, серозно-папиллярная, муцинозная аденокарцинома, железис-

то-плоскоклеточный рак) РТМ (16,5 %), при этом особенно при ПВ стадии (18,2 %) и реже — при ПА стадии (12,5 %). Обращает на себя внимание также то, что при РТМ с переходом на шейку матки почти у каждой 4-й пациентки (23,8 %) диагностируется эндометриодная аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией. Следует отметить, что данный гистологический вариант наблюдается при ПВ стадии в 3 раза чаще (29,8 %), чем при ПА стадии (9,4 %) (см. табл. 1).

Помимо определения гистологического типа аденокарциномы, в каждом наблюдении определяли степень дифференцировки, выделяя:

- высокодифференцированную;
- умереннодифференцированную;
- низкодифференцированную.

Микроскопическое определение степени дифференцировки эндометриальной аденокарциномы осуществляли по архитектурным и ядерным признакам. Градация архитектурных признаков основывалась на соотношении железистых и солидных участков в опухоли без учета морулярных структур или фокусов плоскоклеточной метаплазии.

Эндометриальную аденокарциному 1 типа (эндометриодную и муцинозную) оценивали, исходя из следующих критериев:

- высокодифференцированная аденокарцинома — менее или 5 % несквамозных, неморулярных структур с солидным типом роста;
- умереннодифференцированная аденокарцинома — 6-50 % несквамозных, неморулярных структур с солидным типом роста;
- низкодифференцированная аденокарцинома — более 50 % несквамозных, неморулярных структур с солидным типом роста.

Высокодифференцированная эндометриодная аденокарцинома отмечена у 31 (47,7 %) больной РТМ II стадии, умеренно- и низкодифференцированная — у 21 (32,3 %) и 13 (20 %) пациенток соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от степени дифференцировки эндометриодной аденокарциномы

Степень дифференцировки опухоли	II стадия		ПА стадия		ПВ стадия	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Высокая	31	47,7	14	56	17	42,5
Умеренная	21	32,3	7	28	14	35
Низкая	13	20	4	16	9	22,5
ВСЕГО	65	100	25	100	40	100

Эндометриодная аденокарцинома высокой степени дифференцировки наблюдается чаще при ПА стадии (56 %) в сравнении со ПВ стадией (42,5 %) и наоборот, умеренно- и низкодифференцированные опухоли диагностированы реже при ПА стадии (28 % и 16 % соответственно), чем при ПВ стадии (35 % и 22,5 % соответственно) (см. табл. 2).

Нами проведено определение степени клеточного и ядерного полиморфизма (анаплазии), что зависело от выраженности изменений размеров, формы и гиперхромазии ядер:

- низкая;
- умеренная;
- высокая.

Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от данного морфологического признака представлено на рис. 2.

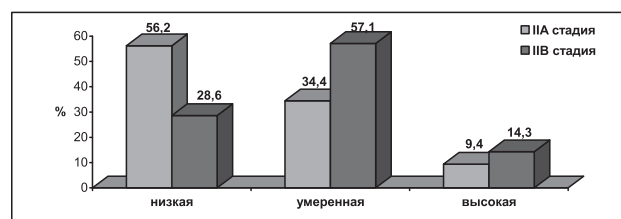


Рис. 2. Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от степени клеточной и ядерной анаплазии опухоли

Низкая степень клеточной и ядерной анаплазии при РТМ II стадии отмечена у 40 больных (36,7 %). В большинстве наблюдений у 55 пациенток (50,5 %) определялась умеренная степень анаплазии, а высокая степень диагностировалась только у 14 больных (12,8 %). Подобная картина наблюдалась и при ПВ стадии.

Однако при ПА стадии низкая степень клеточной и ядерной анаплазии встречалась почти в 2 раза чаще, чем умеренная (56,2 % и 34,4 % соответственно). Высокая степень анаплазии определялась в 9,4 % случаев.

При сопоставлении распределения больных по данному морфологическому признаку обнаружено вдвое больше больных с низкой степенью и, наоборот, почти вдвое меньше пациенток с умеренной степенью анаплазии при ПА стадии в сравнении с ПВ стадией. Отмечается некоторое увеличение числа больных с высокой степенью анаплазии при ПВ стадии, чем при ПА стадии.

Поражение эндометриальной аденокарциномой цервикального канала происходило несколькими путями.

Распространение только в пределах слизистой оболочки, без инвазии в подлежащую строму шейки матки отмечено в 32 (29,4 %) наблюдениях (II стадия) (рис. 3). При этом распространение происходило либо в виде сплошного пласта (рис. 4) за пределы внутреннего зева на слизистую эндоцервикса различной протяженности, вплоть до наружного зева — у 25 (78,2 %) пациенток; либо отдельных одиночных — у 5 (15,6 %) больных или множественных имплантатов на слизистой, нередко полиповидной формы, — у 2 (6,3 %) пациенток (рис. 5).

Инфильтрация и слизистой, и стромы эндоцервикса (ПВ стадия РТМ) отмечена у 75 (68,8 %) больных (рис. 6).

Инфильтрация только стромы эндоцервикса при наличии интактной слизистой (ПВ стадия РТМ) отмечена у 2 (1,8 %) пациенток (рис. 7).

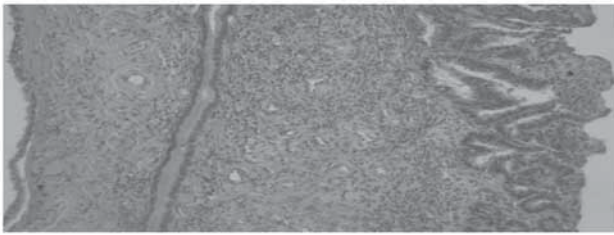


Рис. 3. Высокодифференцированная эндометриодная аденокарцинома с ростом по поверхности слизистой эндоцервикса. Наботова киста в подлежащей строме шейки (Б- 5101 /92). ×120. Окраска гематоксилином и эозином

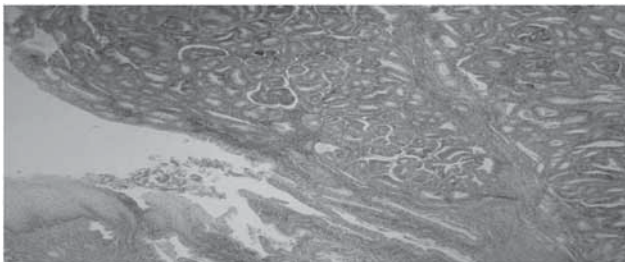


Рис. 4. Эндометриодная аденокарцинома с вращением в виде пласта в цервикальный канал до наружного зева без признаков инвазии в строму шейки (Б- 3428/91). ×80. Окраска Ван-Гизон

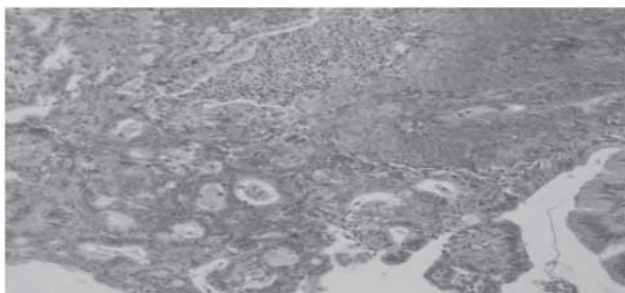


Рис. 5. Полиповидный имплантант эндометриодной аденокарциномы с плоскоклеточной метаплазией на поверхности слизистой эндоцервикса, без инвазии в подлежащую строму шейки. Внизу справа — фрагмент нормальной слизистой эндоцервикса (Б- 7564/91). ×120. Окраска гематоксилином и эозином

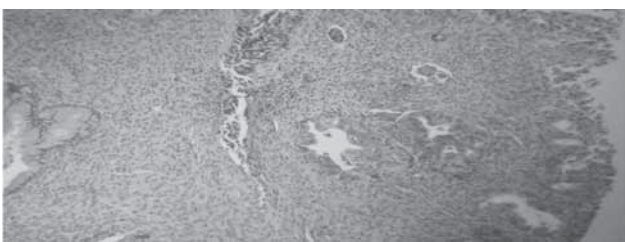


Рис. 6. Распространение эндометриодной аденокарциномы по поверхности слизистой эндоцервикса с началом инвазии в подлежащую строму шейки по лимфоваскулярным пространствам. Слева видна нормальная железа эндоцервикальной слизистой (Б- 7564/91). ×100. Окраска гематоксилином и эозином

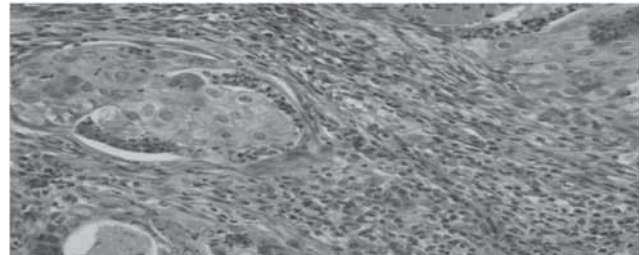


Рис. 7. Инвазивный рост эндометриодной аденокарциномы с плоскоклеточной метаплазией в строме шейки (инфильтративный характер инвазии) без поражения слизистой эндоцервикса. Комплексы раковых клеток в лимфо-васкулярных пространствах, высокая плотность микрососудов и воспалительная инфильтрация в зоне инвазии (Б- 8312 /91). ×160. Окраска гематоксилином и эозином

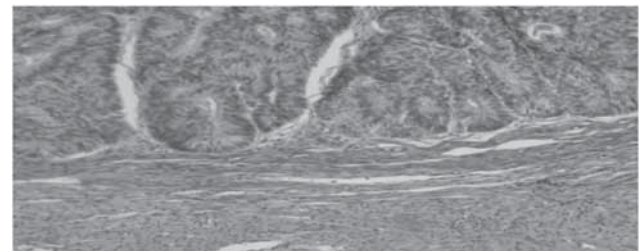


Рис. 8. Эндометриодная аденокарцинома, экстенсивный (оттесняющий) характер инвазии в миометрий, низкая плотность микрососудов (Б-3428/91). ×120. Окраска гематоксилином и эозином

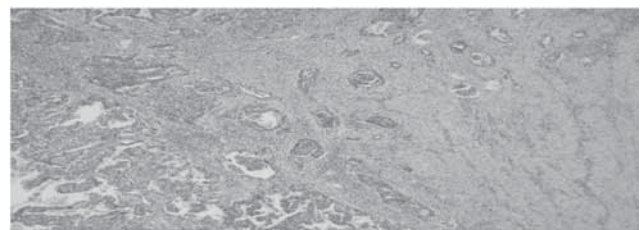


Рис. 9. Эндометриодная аденокарцинома, инфильтративный характер инвазии в миометрий (Б- 16199/99). ×80. Окраска гематоксилином и эозином

Среди морфологических критериев, характеризующих особенности инвазии опухоли в подлежащий миометрий, выделяли оттесняющий (неинфильтративный) характер инвазии, когда опухоль погружалась в подлежащий миометрий в виде четко отграниченных язычков или булавовидных массивов, сдавливая и оттесняя подлежащий миометрий (рис. 8), и инфильтративный характер инвазии, при котором комплексы опухолевых клеток беспорядочно очагово или диффузно врастали в подлежащий миометрий между гладкомышечными волокнами и по лимфо-васкулярным просветам (рис. 9). Оценивая характер инвазии опухоли в миометрий при РТМ II стадии, обнаружили, что пре-

валирует инфильтративный тип распространения в сравнении с оттесняющим, у 89 (81,7 %) и 20 (18,3 %) пациенток соответственно.

Так же, как и в миометрии, выделяли оттесняющий и инфильтративный характер инвазии опухоли в строму шейки матки при ПВ стадии РТМ. Следует отметить, что при анализе данного морфологического признака выявлено преобладание инфильтративного типа врастания — у 61 (79,2 %) больных (см. рис. 7), а оттесняющий характер инвазии встречался почти в 4 раза реже — у 16 (20,8 %) пациенток (рис. 10).

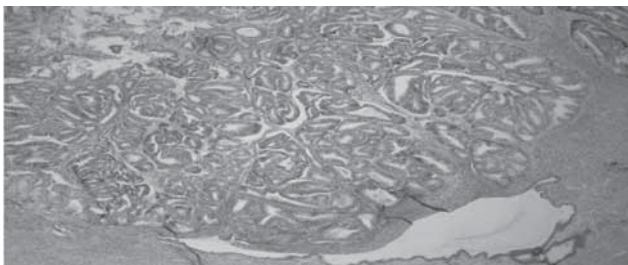


Рис. 10. Эндометриоидная аденокарцинома с врастанием в цервикальный канал, экстенсивный (оттесняющий) характер инвазии в строму шейки не глубже уровня нормальных эндоцервикальных желез (внизу) (Б-3428/91). $\times 100$. Окраска Ван-Гизон

Во всех наблюдениях измеряли глубину инвазии опухоли в строму шейки матки и в миометрий в мм при помощи координатного предметного столика микроскопа с препаратодержателем, снабженным линейкой и линейным нониусом. При замере глубины инвазии определяли не толщину опухоли, а непосредственно глубину прорастания ее в подлежащую ткань миометрия и/или строму шейки матки, принимая за начальную точку отсчета уровень расположения поверхности нормальной слизистой экто- и эндоцервикса, т. е. не учитывался экзофитный компонент опухоли, а при замере глубины инвазии в миометрий за начальную точку отсчета принимался уровень границы между нормальным эндометрием и миометрием. Конечной точкой замера глубины инвазии являлись наиболее удаленные от поверхности слизистой фокусы и комплексы опухолевой ткани, включая эмболы в просветах кровеносных и лимфатических сосудов стромы шейки матки и ткани миометрия.

Глубина инвазии опухоли в миометрий при РТМ II стадии варьировала в широких пределах: от 0 мм до 26 мм и в среднем составляла $8,4 \pm 0,54$ мм. Наиболее глубокой инвазия была в случаях с инфильтративным характером врастания в миометрий и при высокой плотности микрососудов в зоне инвазии.

Анализируя распределение больных РТМ II стадии с учетом глубины инвазии неоплазии в мышечную оболочку матки, обнаружили, что рост опухоли в пределах эндометрия имел место у 7 (6 %) пациенток; до 0,5 см — у 32 (29 %) больных; от 0,5 до 1 см — у 39 (36 %); более 1 см — у 28 (26 %) больных; распростра-

нение до серозной оболочки тела матки — у 3 (3 %) пациенток. Следовательно, инвазия в миометрий более 0,5 см встречалась в 65 % случаев. В зависимости от стадии заболевания больные распределились согласно табл. 3.

Таблица 3

Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от глубины инвазии опухоли в миометрий

Глубина инвазии	II стадия		IIIa стадия		IIIb стадия	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
В пределах эндометрия	7	6	4	13	3	4
До 0,5 см	32	29	10	31	22	29
От 0,5 до 1 см	39	36	11	34	28	36
Более 1 см	28	26	7	22	21	27
До серозы	3	3	0	0	3	4

При РТМ с вовлечением только эндоцервикальных желез (IIIa стадия) опухоль располагалась в пределах эндометрия у 4 пациенток (13 %); до 0,5 см — у 10 (31 %); от 0,5 до 1 см — у 11 (34 %); более 1 см — у 7 (22 %); ни у одной больной опухоль не проросла до серозы.

При РТМ с врастанием в строму шейки матки (IIIb стадия) у 3 (4 %) пациенток опухоль локализовалась в пределах эндометрия; у 22 (29 %) опухоль проросла на глубину до 0,5 см; у 28 (36 %) — от 0,5 до 1 см; у 21 (27 %) — более 1 см и у 3 (4 %) пациенток опухоль распространялась до серозного покрова матки.

Сравнительное изучение показало, что при IIIa стадии практически в 3 раза больше больных с расположением опухоли в пределах эндометрия (13 %), чем при IIIb (4 %), а также пациенток при IIIa стадии с инвазией опухоли до серозы не выявлено.

При микроскопическом исследовании удаленного препарата определяли глубину инвазии опухоли в шейку матки. Она варьировала в широких пределах: от 0 мм до 19 мм и в среднем составляла $6,6 \pm 0,46$ мм. Наиболее глубокой инвазия была в случаях с инфильтративным характером врастания и при высокой плотности микрососудов в зоне инвазии.

Распределение больных с IIIb стадией РТМ в зависимости от глубины инвазии в строму шейки матки отражено на рис. 11.

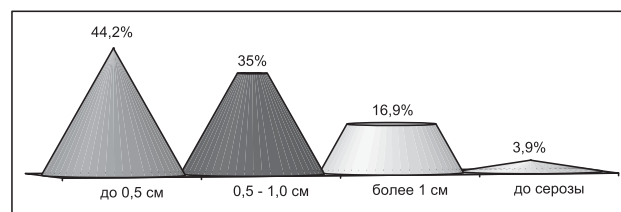


Рис. 11. Распределение больных РТМ IIIb стадии в зависимости от глубины инвазии в строму шейки матки

При оценке глубины инвазии опухоли в строму шейки матки при IIIb стадии выявлено, что в большинстве наблюдений (44,2 %) данный показатель ограничивался 0,5 см. Врастание на глубину от 0,5 до 1 см

встречалось у 27 пациенток (35 %), более 1 см — у 13 (16,9 %), а распространение поражения до серозной оболочки шейки матки — у 3 (3,9 %).

При 2-факторном анализе выявлена взаимосвязь между глубиной инвазии в миометрий и шейку матки у больных раком тела матки II стадии. Так, увеличение глубины прорастания мышечной оболочки тела матки влечет за собой более глубокое поражение опухолью стромы шейки матки (рис. 12).

При расположении опухоли в пределах эндометрия наиболее часто (у 13 %) встречается поражение эндоцервикальных желез. При прорастании миометрия на глубину до 0,5 см у 1/3 больных (35,3 %) наблюдается поражение шейки матки также на 0,5 см, а у каждой 4-й (25 %) — более 0,5 см. При глубине инвазии мышечной оболочки тела матки от 0,5 до 1 см почти у половины пациенток (44,1 %) имеет место поражение шейки матки до 0,5 см, у каждой 3-й — вовлечение эндоцервикальных желез (34 %) и прорастание от 0,5 до 1 см шейки матки (33,3 %), а у каждой 4-ой (25 %) — инвазия более 1 см. У 40,7 % и 50 % больных с инвазией шейки матки от 0,5 до 1 см и более 1 см соответственно наблюдалась глубина прорастания миометрия более 1 см.

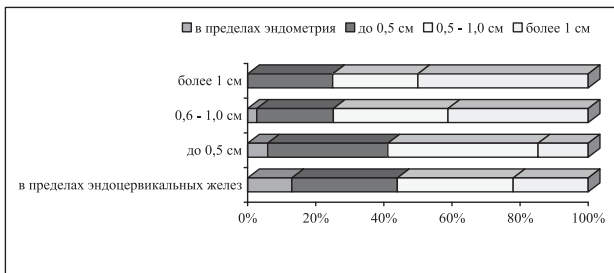


Рис. 12. Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от глубины инвазии в миометрий и глубины инвазии в шейку матки

Во всех случаях выявляли наличие или отсутствие инвазии опухоли в лимфатические и кровеносные сосуды как в миометрии, так и в строме шейки матки — т. е. существование пространств, ограниченных эндотелием и содержащих комплексы раковых клеток.

У 66 (60,6 %) больных РТМ II стадии было диагностировано наличие лимфоваскулярной инвазии в миометрии, а соответственно 43 (39,4 %) пациентки не имели данного морфологического признака.

Из табл. 4 следует, что при ПА стадии больные распределились в зависимости от наличия этого признака поровну, а при ПВ стадии инвазия в лимфоваскулярные пространства в миометрии отсутствовала только у 1/3 больных (33,8 %).

При сопоставлении стадий РТМ отмечено, что при ПВ стадии несколько чаще встречается лимфоваскулярная инвазия в миометрии (66,2 %) и реже (50 %) при ПА стадии, и наоборот, реже отсутствует данный морфологический признак (33,8 %) при ПВ стадии в сравнении с ПА стадией (50 %).

Таблица 4

Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от наличия лимфоваскулярной инвазии в миометрии

Наличие лимфоваскулярной инвазии	II стадия		ПА стадия		ПВ стадия	
	Число больных	%	Число больных	%	Число больных	%
Присутствует	66	60,6	16	50	51	66,2
Отсутствует	43	39,4	16	50	26	33,8

В зависимости от наличия или отсутствия инвазии в просветах лимфатических и кровеносных сосудов шейки матки при ПВ стадии РТМ (см. рис. 8) больные распределились примерно поровну (51,9 % и 48,1 % соответственно).

Нами изучалась плотность микрососудов (неоангиогенез) в зоне наибольшей инвазии опухоли у больных РТМ II стадии (рис. 13). Высокая плотность микрососудов (обилие сосудов капиллярного типа) наблюдалась у 43 (39,4 %) больных, а низкая (отсутствие сосудов капиллярного типа или единичные) у 66 (60,6 %) пациенток (табл. 5).

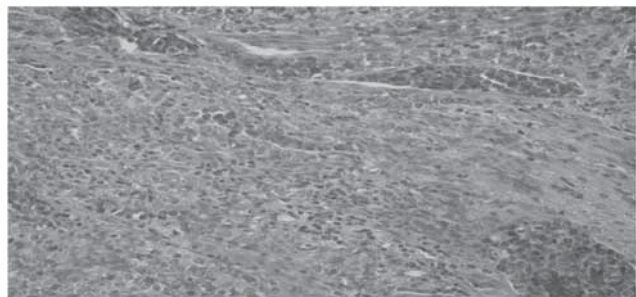


Рис. 13. Инвазия эндометриоидной аденокарциномы в миометрий (инфильтративный тип), высокая плотность микрососудов и воспалительная инфильтрация в зоне инвазии (Б-15108 /91). ×100. Окраска гематоксилином и эозином

Таблица 5

Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от плотности микрососудов в зоне наибольшей инвазии опухоли

Плотность микрососудов	II стадия		ПА стадия		ПВ стадия	
	Число больных	%	Число больных	%	Число больных	%
Высокая	43	39,4	7	21,8	36	46,8
Низкая	66	60,6	25	78,2	41	53,2

Больные РТМ ПВ стадии с учетом данного морфологического признака распределились примерно поровну (46,8 % и 53 % соответственно). При этом только 4-я часть пациенток (21,8 %) при ПА стадии имела высокую плотность микрососудов, а у большинства больных (78,2 %) определялась низкая плотность.

Сопоставляя данные табл. 5, выявили, что при ПА стадии высокая плотность микрососудов в зоне наибольшей инвазии опухоли встречается в 2 раза реже

(21,8 %), нежели при ПВ стадии (46,8 %). В то же время низкая плотность наблюдается чаще при ПА в сравнении с ПВ стадией (78,2 % и 53,2 % соответственно).

Оценивая данные распределения больных РТМ II стадии в зависимости от наличия очагов некроза в опухоли, следует отметить, что этот морфологический признак присутствовал у 1/3 (32,1 %) пациенток. Чаще всего зоны некроза встречались в низкодиффе-

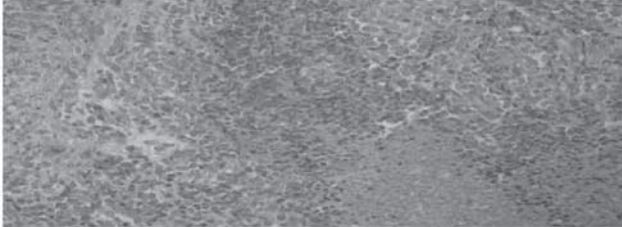


Рис. 14. Низкодифференцированная эндометриоидная аденокарцинома с зонами некроза (Б-15108 /91). ×100. Окраска гематоксилином и эозином

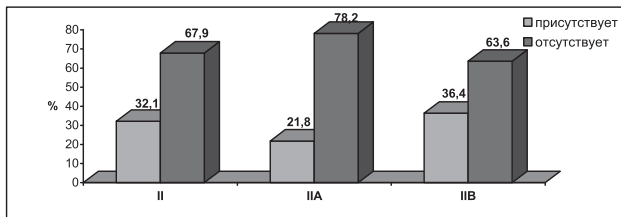


Рис. 15. Распределение больных РТМ II стадии в зависимости от наличия очагов некроза в опухоли

ренцированных аденокарциномах с инфильтративным характером инвазии (рис. 14).

При сравнении данных представленных на рис. 15, оказалось, что очаги некроза в опухоли встречаются у каждой 3-й (36,4 %) больной при ПВ стадии и только у каждой 4-й (21,8 %) при ПА стадии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствует, что РТМ II стадии имеет ряд отличительных морфологических особенностей, характерных как для ПА, так и для ПВ стадий.

Таким образом, хотелось бы выразить пожелание морфологам о включении в гистологическое заключение целого ряда вышеописанных характеристик как первичной, так и опухоли в шейки матки, что может при сопоставлении с отдаленными результатами лечения выявить благоприятные и неблагоприятные факторы прогноза. Улучшение же прогнозирования течения заболевания позволит клиницистам разработать пути повышения эффективности лечения групп больных с неблагоприятным прогнозом при РТМ II стадии. Последнее нуждается в дальнейшем углубленном изучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Баринов В. В.* Рак тела матки (диагностика, лечение, факторы прогноза): Автореф. дис. д-ра мед. наук. — М., 1999. — 48 с.
2. *Бохман Я. В., Бонтэ Я., Вишневский А. С. и др.* Гормонотерапия рака эндометрия. — СПб., 1993. — 163 с.
3. *Козаченко В. П.* Рак матки. — М., 1983. — 157 с.
4. *Максимов С. Я.* Минимальный рак эндометрия. — СПб.: Гиппократ, 1992.
5. *Олейник В. В.* Актуальные вопросы онкологии // Материалы международного симпозиума. — СПб., 14-17 мая 1996 года. — С. 216–217.
6. Announcements: FIGO stages 1988 revision // *Gynecol. Oncol.* 1989. — Vol. 35. — P. 125–126.
7. *Blake P., Lodge N., A'Hern R.* An audit of outcome of adjuvant post-operative radiotherapy for 52 women with stage II carcinoma of endometrium // *The British J. of Radiology.* — 2000. — Vol. 73. — P. 987–993.
8. *Cornelison T. L., Trimble E. L., Kosary C. L.* SEER Data, Corpus Uteri Cancer: Treatment trends versus survival for FIGO stage II, 1988-1994 // *Gynecol. Oncol.* — 1999. — Vol. 74. — P. 350–355.
9. *Eltabbakh G. H., Alison D. et al.* Survival of women with surgical stage II endometrial cancer // *Gynecol. Oncol.* — 1999. — Vol. 74. — P. 80–85.
10. *Feltmate C. M., Duska L. R., Y. Chiao et al.* Predictors of recurrence in surgical stage II endometrial adenocarcinoma // *Gynecol. Oncol.* — 1999. — Vol. 73. — P. 407–411.
11. *Jobsen J. J., Schutter E. M., Meerwaldt J. H.* Treatment results in women with clinical stage I and pathologic stage II endometrial carcinoma // *Int. Gynecol. Cancer.* — 2001. — Vol. 11 (1). — P. 49–53.
12. *Lanciano R. M., Curran W. J., Greven K. M. et al.* Influence of grade, histologic subtype and timing of radiotherapy on outcome among patients with stage II carcinoma of the endometrium // *Gynecol. Oncol.* — 1990. — Vol. 39. — P. 368–373.
13. *Mannel R. S., Berman M. L., Walker J. L. et al.* Management of endometrial carcinoma with suspected cervical involvement // *Obstet. Gynecol.* — 1990. — Vol. 75. — P. 1016–1022.
14. *Mariani A., Webb J., Galli L. et al.* Potential therapeutic role of paraaortic lymphadenectomy in node-positive endometrial cancer // *Gynecol. Oncol.* — 2000. — Vol. 76. — P. 348–356.
15. *Morrow C. P., Brain N. B., Roberts J. et al.* Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a gynecologic oncology group study // *Gynecol. Oncol.* — 1991. — Vol. 40. — P. 55–65.
16. *Morrow C. P., Curtin J. P.* Gynecologic cancer surgery. — New York, 1996. — P. 569–597.
17. *Ng T. Y., Nicklin J. L., Perrin L. C. et al.* Postoperative vaginal vault brachytherapy for node-negative stage II (occult) endometrial carcinoma // *Gynecol. Oncol.* — 2001. — Vol. 81. — P. 193–195.
18. *Novak's Gynecology.* — 2002. — Ed. Berek J.S., Adashi E.Y., Hillard P.A. — «Williams and Wilkins».

19. *Pettersson F.* Annual report on the results of treatment in gynecologic cancer. Stockholm, Sweden: Radiumhemmet. // *Int. Fed. Of Gynecol. And Obstet.* — 1995. — P. 65–82.

20. *Pitson G., Colgan T., Levin W. et al.* Stage II endometrial carcinoma: prognostic factors and risk factors in 170 patients // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* — 2002. — Vol. 35(4). — P. 862–867.

21. *Rubin et al.* Management of endometrial carcinoma with cervical involvement // *Gynecol. Oncol.* — 1992. — Vol. 45. — P. 294–298.

22. *Sartori E., Gadducci A., Landoni F. et al.* Clinical behavior of 203 stage II endometrial cancer cases: the impact of primary surgical approach and of adjuvant radiation therapy // *Int. J. Gynecol. Cancer.* — 2001. — Vol. 11. — P. 430–437.

23. *Scurry J., Crighead P., Duggan M.* Histologic study of patterns of cervical involvement in FIGO stage II endometrial carcinoma // *Int. J. Gynecol. Cancer.* — 2000. — Vol. 10. — P. 497–502.

24. *Sevin B. U., Knapstein P. G., Kochli O. R.* Multymodality therapy in gynecologic oncology. — «Thieme», Stuttgart, New York, 1996. — P. 31–53.

25. *William P. Irvin, Laura W. Rice* Benefit in treatment of endometrial carcinoma // *J. Reprod. Med.* — 2002. — Vol. 47 (3). — P. 173–189.

26. *Wolfson A. H., Sighler S. E., Markoe A. M. et al.* The prognostic significance of surgical staging for carcinoma of the endometrium // *Gynecol. Oncol.* — 1992. — Vol. 45. — P. 142–146.

Поступила 25.04.2006.

УДК 616-006-033.2:576.385.5

S. M. Kiselev¹, A. V. Akleev², A. M. Kozlov¹

THE METHOD OF ESTIMATION OF TUMOR CELLS' INVASIVE ACTIVITY FOR CHOICE THE POTENTIAL INHIBITORS OF METASTASIS

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow
²Ural Research Practice Center of Radiation Medicine, Chelyabinsk

ABSTRACT

Contemporary understandings of cellular and molecular mechanisms of tumor invasion and metastatic dissemination validate a possibility for rational search of metastasis dissemination inhibitors with pathogenetic function. The effectiveness of such work depends substantially on the adequate choice of model systems *in vitro* corresponding to the integral process of metastatic dissemination *in vivo*. However, most of the methodologies in use are far from being perfect. We have improved the test system for assessment of tumor cell invasive activity based on the cell ability to penetrate through artificial basal membrane of connective tissue proteins. In particular, we developed conditions for modeling connective tissue barrier, determined the choice of optimal chemo-attractant and performed optimization of parameters for quantitative interpretation of data obtained. Based on modified methodology we have studied the anti-invasive activity of agent Ilomastat. Our findings indicate that Ilomastat possesses anti-invasive activity correlating with its activity in inhibiting metal-proteinase function. Therefore, the test system based on assessment of tumor cell invasive activity can be used for searching potential inhibitors of metastasis dissemination with pathogenetic function.

Key words: metastatic dissemination, invasion test, matrigel.

S. M. Kiselev,¹ A. V. Akleev,² A. M. Kozlov¹

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНВАЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ОТБОРЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

¹ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва
²ФГУ Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск

РЕЗЮМЕ

Современные представления о клеточных и молекулярных механизмах инвазии и метастазирования злокачественных опухолей обосновывают возможность рационального поиска ингибиторов метастазирования с патогенетической направленностью действия. Эффективность этой работы в большой степени зависит от степени адекватности модельных систем *in vitro* интегральному процессу метастатической диссеминации *in vivo*. Однако большинство используемых в настоящее время методических подходов к решению этой задачи далеки от совершенства. Нами усовершенствована тест-система для оценки инвазивной активности опухолевых клеток, основанная на их способности проникать через искусственную базальную мембрану из белков соединительной ткани. В частности, разработаны условия моделирования соединительнотканного барьера, осуществлен выбор оптимального хемоаттрактанта, оптимизированы параметры количественной интерпретации результатов теста. С использованием модифицированной методики изучена антиинвазивная активность препарата иломастат. Получены данные, свидетельствующие о наличии антиинвазивной активности иломастата, коррелирующие с его способностью подавлять активность металлопротеиназ. Таким образом, тест-система, основанная на оценке инвазивной активности опухолевых клеток, может быть использована для поиска потенциальных ингибиторов метастазирования с патогенетической направленностью действия.

Ключевые слова: метастазирование, инвазивный тест, матригель.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время получены важные научные данные, конкретизирующие представления о клеточных и молекулярных механизмах метастатической диссеминации злокачественных новообразований. На их основе разрабатываются способы селективного влияния препаратов на биологические процессы, лежащие в основе феномена метастазирования. Средства, обладающие способностью избирательно регулировать эти процессы, рассматриваются как потенциальные ингибиторы метастазирования. На последующих этапах они изучаются на моделях метастазирующих опухолей *in vivo*, но уже на рациональной основе, с учетом данных о молекулярных аспектах механизма их действия. Сведения, получаемые с использованием тест-систем *in vitro*, необходимы для построения рациональных схем применения терапевтических средств с патогенетической направленностью действия при монотерапии, а также в режимах сочетанного применения с традиционными методами терапии злокачественных новообразований.

Учитывая комплексный характер процесса метастазирования злокачественных новообразований, при отборе антиметастатических средств наиболее остро встает вопрос о выборе адекватной модельной системы *in vitro*, наиболее полно отражающей биологические процессы, опосредующие основные этапы метастатического каскада *in vivo*.

Несмотря на индивидуальные особенности метастазирования разных типов опухолей, можно выделить следующие характерные этапы развития метастатического процесса: появление в популяции опухолевых клеток первичного очага клеток с выраженным метастатическим фенотипом, характеризующихся, в частности, высокой инвазивной активностью, проникновение опухолевых клеток в кровь и лимфу, задержка опухолевых клеток в капиллярной сети органа-мишени, проникновение в ткань органа и возникновение вторичных опухолевых образований.

Специфические адгезивные взаимодействия между опухолевыми клетками и клетками стромы в первичном очаге опухолевого роста являются важными звеньями процесса метастазирования. При метастатической диссеминации характер адгезивных свойств опухолевых клеток обуславливает особенности их взаимодействия с микроокружением здоровой ткани-мишени и определяет вероятность формирования метастатического узла.

В связи с этим изучение влияния тестируемых соединений на особенности адгезивных взаимодействий между опухолевыми клетками, с одной стороны, и опухолевыми клетками и компонентами соединительной ткани, с другой, является одним из наиболее частых предметов исследования в системе *in vitro* для оценки потенциальной антиметастатической активности препаратов. В качестве примера применяемых в настоящее время таких тест-методов можно привести следующие: агрегационный тест, основанный на изучении действия соединений на функциональную

активность — кадгерин-катенинового комплекса, определяющего адгезионные взаимодействия между опухолевыми клетками эпидермального происхождения; миграционный тест в камере Боудена, позволяющий оценить действие соединений на миграцию опухолевых клеток к хемоаттрактанту; адгезивный тест, основанный на изучении способности тестируемых соединений влиять на процесс прикрепления опухолевых клеток к подложке из полимеризованных белков соединительной ткани [7; 9; 13].

Особый интерес представляет моделирование систем, позволяющих проводить интегральную оценку тестируемых соединений на совокупность биологических процессов, задействованных в метастатическом каскаде. С этих позиций более адекватной моделью является инвазивный тест, заключающийся в оценке влияния тестируемых соединений на способность опухолевых клеток проникать через барьер из белков соединительной ткани.

Правомочность применения инвазивного теста для поиска и отбора ингибиторов метастазирования с патогенетической направленностью действия обусловлена рядом причин. Во-первых, способность опухолевых клеток к инвазивному росту является одним из ключевых свойств клеток злокачественной опухоли, обуславливающих распространение опухолевых клеток в прилежащие нормальные ткани, сопровождающееся разрушением и замещением их опухолью. Во-вторых, процесс инвазии является комплексным событием, включающим адгезию клеток к субстрату, локальный протеолиз соединительнотканного матрикса и миграцию клеток по градиенту концентрации хемоаттрактанта. Это позволяет, как отмечалось выше, провести интегральную оценку активности соединений в отношении совокупности биологических процессов, участвующих в процессе метастазирования [1].

Цель настоящей работы — модификация тест-системы для оценки инвазивной активности опухолевых клеток и отбора на ее основе потенциальных ингибиторов метастазирования с патогенетической направленностью действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и условия их культивирования

В работе использованы клеточные линии фибросаркомы человека HT1080 и фибробластов мыши 3Т3.

Клетки фибросаркомы человека HT1080 и фибробластов мыши 3Т3 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% ТЭС (Eurobio), L-глутамин (1мМ), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100мкг/мл), пириват и комплекс аминокислот и витаминов (Eurobio).

Подготовка опухолевых клеток для проведения инвазивного теста

Клетки культивировали до достижения 50-60 % монослоя и трипсинизировали (0,05%-ным раствором трипсин-версена). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя Трипанового синего (0,1%-ный раствор трипанового синего в ФСБ). Для проведения

инвазивного теста уровень жизнеспособности культуры должен составлять не менее 95 %. Клетки считали в камере Горяева и высевали на предварительно подготовленную мембрану с матригелем.

Приготовление кондиционированной среды фибробластов мыши 3Т3

Клетки растили до достижения неплотного монослоя в культуральных флаконах (162 см²), удаляли ростовую среду, промывали дважды фосфатно-солевым буфером и предынкубировали в течение 4 ч в 30 мл бессывороточной среды. После этого меняли новую порцию бессывороточной среды (30 мл) и инкубировали в течение 72 ч. Среду центрифугировали при 1500 г в течение 10 мин, супернатант отбирали и замораживали до -20 °С.

Инвазивный тест

Постановку теста осуществляли в 24-луночных планшетах со вставочными ячейками, разделяющими лунку на 2 части полупроницаемой полимерной мембраной с диаметром пор 8 мкм. Для покрытия мембран использовали матригель (Matrigel GFR, Vecton Dickinson) [11]. Вставочные ячейки помещали в 24-луночный планшет, заполненный культуральной средой без сыворотки и вакуумировали в течение 10 мин для удаления воздуха из пор мембраны. Матригель (10 мг/мл) разбавляли на холоду ТРИС-буфером и наносили на полупроницаемую мембрану. Ячейки с нанесенным слоем матригеля инкубировали в термостате при 37 °С в течение 2 ч при 40–60 % влажности (для агрегации соединительнотканых белков на мембране) с последующим высушиванием мембран в течение сут при 30 °С и 50 % влажности. Перед непосредственным проведением инвазивного теста проводили регидратацию полимеризованного на мембране матригеля. Для этого вставочные ячейки с нанесенным матригелем помещали в 24-луночный планшет, заполняли бессывороточной культуральной средой (DMEM, 0,1 % БСА) и инкубировали в CO₂ — термостате при 37 °С в течение 2 ч. Непосредственно перед проведением теста нижнюю камеру заполняли хемоаттрактантом. Клетки высевали на мембрану с матригелем и инкубировали в CO₂-инкубаторе (5 % CO₂, 37 °С) в течение времени, подобранного экспериментально. Опыт проводили в 3 параллелях.

Количественная интерпретация результатов инвазивного теста

По окончании инкубационного периода клетки, не прошедшие через барьер, снимали с внешней поверхности мембраны ватной палочкой, смоченной культуральной средой. Операцию проводили дважды для эффективного удаления клеток.

Вставочные ячейки поочередно помещали в лунки с раствором Лейшмана на 5 мин для фиксации клеток с дистиллированной водой для отмычки фиксирующего раствора и раствором азур-эозина (по Романовскому) для окрашивания клеток. Окраску проводили в течение 30 мин. Клетки считали в 5 рандомизированных полях площадью 1 мм² в каждой из 3 параллельных лунок.

Оценка инвазивной активности опухолевых клеток

Инвазивную активность опухолевых клеток оценивали по формуле:

$$K_{\text{инвазии}} = И/М \cdot 100\%,$$

где $K_{\text{инвазии}}$ — коэффициент инвазии;

И — количество опухолевых клеток, прошедших через мембрану, покрытую матригелем;

М — количество опухолевых клеток, прошедших через мембрану, не покрытую матригелем [15].

Оценка антиинвазивного эффекта тестируемых соединений

Эффективность тестируемого соединения оценивали по степени ингибирования инвазии опухолевых клеток по сравнению с контролем, которым являются клетки, культивируемые без добавления препарата. Количественную оценку ингибирования инвазии тестируемыми соединениями проводили по формуле:

$$КИ* = ((A-B)/A) \cdot 100 \%,$$

где А — количество опухолевых клеток, прошедших через мембрану, покрытую матригелем, без добавления тестируемого соединения;

В — количество опухолевых клеток, прошедших через барьер с добавлением тестируемого соединения [12].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Origin 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе встречаются различные варианты проведения инвазивного теста, в большинстве своем различающиеся составом полимерной матрицы, формирующей искусственный барьер. В качестве основного компонента для его формирования используют различные белки, входящие в состав экстрацеллюлярного матрикса: коллаген I, IV-типа, фибронектин, ламинин и др. [3; 5; 12]. Выбор белкового компонента, используемого для покрытия мембран, обусловлен характером исследуемых соединений. В некоторых работах для создания условий, наиболее приближенных к системе *in vivo*, при моделировании соединительнотканного барьера используют экстракты из различных тканей: амниона, хориоаллантоисной мембраны, стенки мочевого пузыря и др. [10; 14].

В настоящей работе для покрытия полимерных мембран был использован коммерческий препарат — матригель, представляющий собой стандартизованную смесь из белков внеклеточного матрикса: ламинина, коллагена IV типа, гепарансульфатпротеогликанов, энтактина и нидогена, получаемую из экстракта мышечной саркомы EHS, обогащенную белками соединительной ткани. Особый интерес представляет тот факт, что при полимеризации матригеля в соответствующих условиях формируется структура, сходная по составу и свойствам с базальной мембраной [2]. Выполняющая опорную, разграничительную и барьерную функции, она представляет собой тонкофибрилярную пористую полупроницаемую мембрану толщиной 30–35 нм, в состав которой входят коллаген IV и V типов, гликопротеины, а также фибронектин, ламинин и сульфосодержащие протеогликаны. Одним из клю-

чевых моментов механизма метастазирования является преодоление опухолевыми клетками барьера — базальной мембраны. Таким образом, применение матригеля в качестве субстрата для формирования соединительнотканного барьера в тесте на оценку инвазивной активности опухолевых клеток является наиболее оправданным.

Продажный матригель встречается в 2 вариантах, различающихся содержанием ростовых факторов (bFGF, EGF, IGF-1, PDGF, NGF, TGF- β). Для покрытия мембран мы использовали матригель с пониженным содержанием ростовых факторов (Matrigel GFR, Vecton Dickinson). Подобный выбор обусловлен тем, что содержание ростовых факторов в матригеле может значительно влиять на хемотаксические свойства опухолевых клеток (уменьшать их) и приводить к низкой эффективности инвазии опухолевых клеток в направлении хемоаттрактанта. К тому же некоторые ростовые факторы могут существенным образом влиять на пролиферативную (bFGF, EGF, IGF-1) и миграционную (PDGF, TGF- β) активность опухолевых клеток в процессе эксперимента и тем самым вносить дополнительные трудности в трактовку результатов теста.

Оптимизация методики покрытия полупроницаемой мембраны матригелем

Ключевым моментом тест-системы является стандартно-воспроизводимое моделирование искусственного барьера из белков экстрацеллюлярного матрикса, которое заключается в равномерном распределении полимеризованных соединительнотканых белков на поверхности мембраны и в ее порах.

Перед непосредственным нанесением матригеля проводили предварительную подготовку мембраны. Для этого вставочные ячейки в 24-луночном планшете, заполненном дистиллированной водой, помещали в эксикатор и вакуумировали в течение 10 мин. Эта операция позволяет удалить воздух из внутренних пор мембраны, обеспечивая эффективную смачиваемость внутренней поверхности пор и более эффективное заполнение их раствором матригеля.

Обычно в качестве буферной системы для приготовления рабочей концентрации матригеля используют среду для культивирования опухолевых клеток. Однако, как показали наши исследования, распределение матригеля на мембране в данном случае носит очаговый характер с формированием областей, не покрытых белком. Подобное наблюдение можно объяснить неравномерной кристаллизацией солей, содержащихся в культуральной среде при высушивании мембраны.

Для приготовления раствора матригеля мы использовали буферную систему на основе три-(гидроксиметил)-аминометана (ТРИС), содержащую в качестве дополнительных компонентов сахарозу и хлорид натрия. Выбор компонентов буфера разведения обусловлен следующими причинами. Для равномерной полимеризации матригеля на мембране необходимо обеспечить оптимальную скорость агрегации белка для предотвращения образования белковых конгломератов на поверхности мембраны. Известно, что на аг-

грегацию матригеля существенно влияет кислотность среды. Данный процесс проходит преимущественно в щелочной области pH. В связи с этим для приготовления раствора матригеля нами была выбрана буферная система на основе Трис соли (pH=8,0). Для предотвращения спонтанной агрегации белков в процессе полимеризации в раствор нанесения был добавлен хлорид натрия. Для равномерной кристаллизации солей в процессе высушивания мембраны была добавлена сахароза. Для контроля равномерности распределения агрегированного матригеля на поверхности мембраны ее окрашивали раствором красителя Кумасси (0,25г кумасси R-250, 10 мл метанола, 30 мл уксусной кислоты). Использование вышеуказанного буфера для разведения матригеля позволяет добиться равномерного распределения матригеля в виде однородной пленки по всей поверхности мембраны.

Определение оптимального количества матригеля для формирования соединительнотканного барьера

Основными критериями, которыми мы руководствовались при выборе количества матригеля, наносимого на мембрану, являлись эффективность формирования соединительнотканного барьера, исключающего прямую миграцию опухолевых клеток в направлении хемоаттрактанта, а также длительность постановки инвазивного теста.

Выбор оптимальной концентрации матригеля определяли экспериментально, изучая инвазию клеток фибросаркомы человека HT1080. Опухолевые клетки данной линии отличаются высокой степенью биологической агрессивности и широко используются для тестирования соединений на антиинвазивную активность [16]. В качестве отрицательного контроля для оценки эффективности формирования соединительнотканного барьера использовали иммортализованные фибробласты мыши 3Т3.

Матригель (исходный раствор 10мг/мл) разбавляли на холоде модифицированным буфером для посадки до концентрации 1 мг/мл. Снижать рабочую концентрацию матригеля не рекомендуется, поскольку это может ухудшить способность матригеля к агрегации и полимеризации. Абсолютное количество матригеля варьировали путем изменения объема нанесения в диапазоне — 20 до 150мкл.

При низких объемах нанесения — 20 и 30 мкл происходит преимущественное концентрирование белка на периферии мембраны, что приводит к неравномерному распределению матригеля на поверхности мембраны и формированию частично покрытых белком центральных зон, что не исключает возможности проникновения клеток через поры по механизму прямой миграции к хемоаттрактанту (рис. 1). Доказательством этому служат отсутствие существенных различий между инвазивной активностью исследуемых клеточных линий.

При объеме нанесения 50 мкл матригель покрывает мембрану равномерным слоем. При этом выявляются существенные различия в способности клеток исследуемых линий проникать через соединительно-

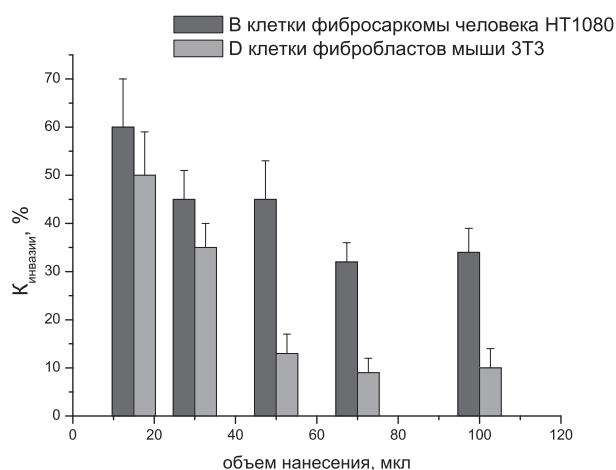


Рис. 1. Влияние количества наносимого на мембрану матригеля на эффективность формирования соединительнотканного барьера

тканый барьер, характеризующие различия в их инвазивной активности (см. рис. 1).

При объемах нанесения матригеля в диапазоне от 50 до 150 мкл выявленная тенденция сохраняется, однако при этом существенно возрастает время проведения эксперимента (рис. 2).

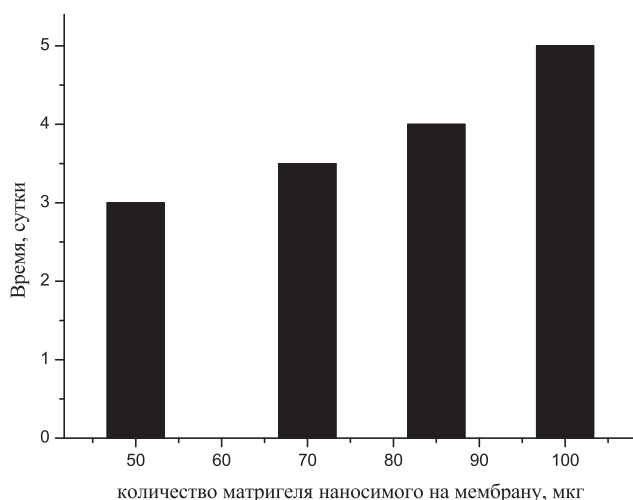


Рис. 2. Временная зависимость проведения теста от количества наносимого на мембрану матригеля

Изучение временного интервала, за который $K_{инв}$ для клеток фибросаркомы человека HT1080 достигает значимого уровня — 30%, показало, что оптимальный объем нанесения матригеля составляет 50 мкл (154 мкг белка/см²).

Выбор хемоаттрактанта

Для оптимизации условий проведения инвазивного теста исследовали влияние различных хемоаттрактантов на временные характеристики процесса инвазии опухолевых клеток линии HT1080. В качестве хемоаттрактантов были использованы культуральная среда DMEM с добавлением смеси белковых факторов

(инсулин-селенит-трансферрин, 100мкг ИСТ на 1 мл среды), культуральная среда RPMI-1640 с добавлением 10 % ТЭС, 20 % ТЭС, кондиционированная среда фибробластов мыши (3Т3). Показано, что применение среды DMEM, 20 % ТЭС и кондиционированной среды фибробластов 3Т3 позволяет на 25–30 % снизить время проведения инвазивного теста (рис. 3).

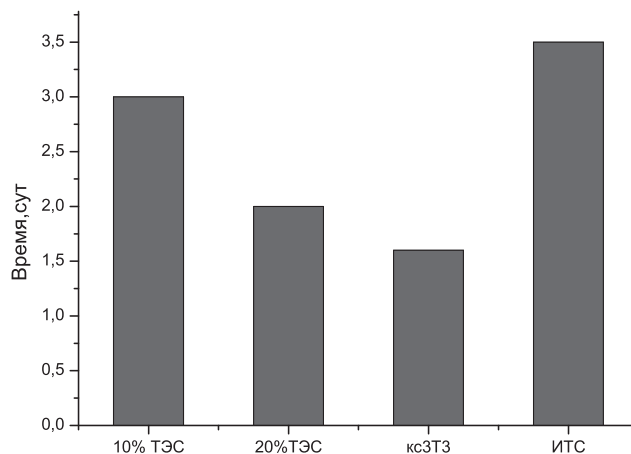


Рис. 3. Влияние хемоаттрактанта на временные характеристики проведения теста (ИТС- инсулин-трансферрин-селенит)

Однако наиболее предпочтительным, по нашему мнению, является использование в качестве хемоаттрактанта для проведения инвазивного теста культуральной среды с 20 % сывороткой вследствие стандартизации ее компонентов.

Оценка антиинвазивной активности препарата Иломастат

На основе разработанных условий проведения инвазивного теста была изучена антиинвазивная активность препарата иломастат. Иломастат (галардин) является ингибитором коллагеназ. Было показано, что данный препарат проявляет выраженную активность в отношении ингибирования активности с ряда матричных металлопротеиназ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9) — протеолитических ферментов, играющих важную роль в процессе опухолевой инвазии [8]. Выявленная исследователями активность иломастата обосновывает целесообразность его изучения на предмет выявления антиинвазивной активности в эксперименте.

Тестировали антиинвазивную активность иломастата на опухолевых клетках фибросаркомы HT1080. Одной из особенностей данной клеточной линии, определяющей ее высокий инвазивный потенциал, является высокий уровень экспрессии матричных металлопротеиназ ММП-2 и ММП-9 [4; 6]

Диапазон рабочих концентраций для тестирования антиинвазивной активности выбирали на основе литературных данных по дозозависимому ингибированию активности металлопротеиназ [8].

Важную роль при оценке антиинвазивной активности играют временные параметры инкубации кле-

ток с тестируемым соединением. Принципиально возможны 2 схемы. 1-я предполагает предварительную инкубацию клеток с тестируемым соединением. При 2-й изучаемые вещества добавляют непосредственно в культуральную среду клеток в момент постановки инвазивного теста.

Одним из недостатков 2-й схемы является невозможность поддержания постоянной концентрации препарата в процессе проведения теста вследствие их диффузии через мембрану с матригелем. Учитывая, что антиинвазивная активность тестируемого соединения может быть обусловлена различными механизмами, требующими для реализации ожидаемого эффекта определенного времени инкубации, нами была выбрана 1-я схема, предполагающая 24-ч предынкубацию опухолевых клеток с тестируемым соединением.

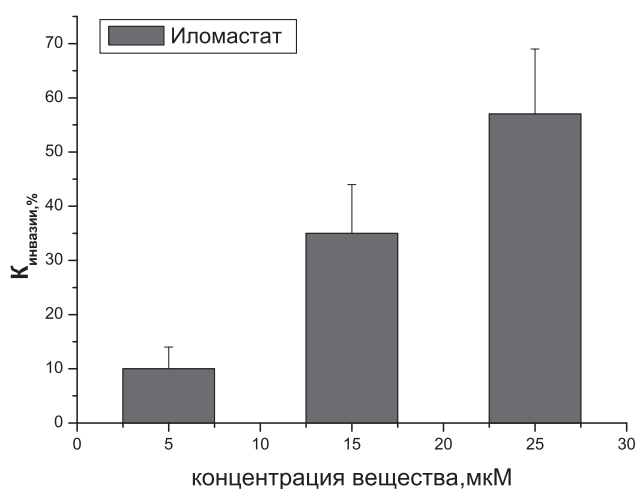


Рис. 4. Ингибирование инвазивной активности клеток фибросаркомы человека иломастатом. Инвазивный тест, 72 ч

Результаты инвазивного теста показали, что иломастат в диапазоне концентраций от 5 до 25 мкМ дозозависимо ингибирует инвазивную активность клеток фибросаркомы (рис. 4 и 5). Наибольший антиинвазивный эффект иломастата составил 57 % при концентрации 25 мкМ. Полученные результаты коррелируют с литературными данными, свидетельствующими о способности иломастата к дозозависимому ингибированию активности металлопротеиназ.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствована тест-система для оценки инвазивной активности опухолевых клеток, основанная на их способности проникать через искусственную базальную мембрану из белков соединительной ткани.
2. С применением модифицированной тест-системы изучена антиинвазивная активность препарата иломастат. Выявлена прямая корреляция между способностью иломастата подавлять процесс инвазии опухолевых клеток и ингибирующей активностью данного соединения в отношении металлопротеи-

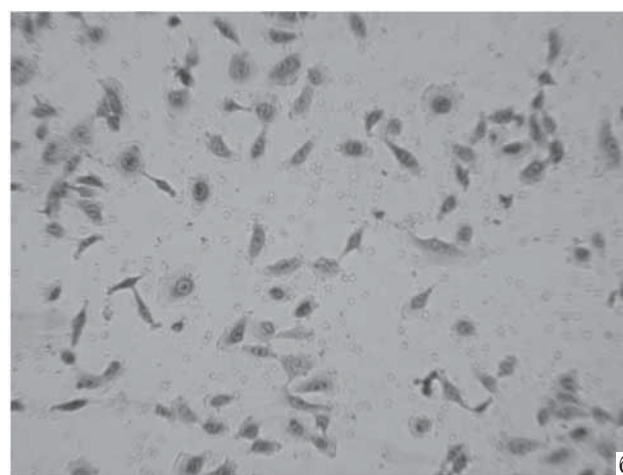
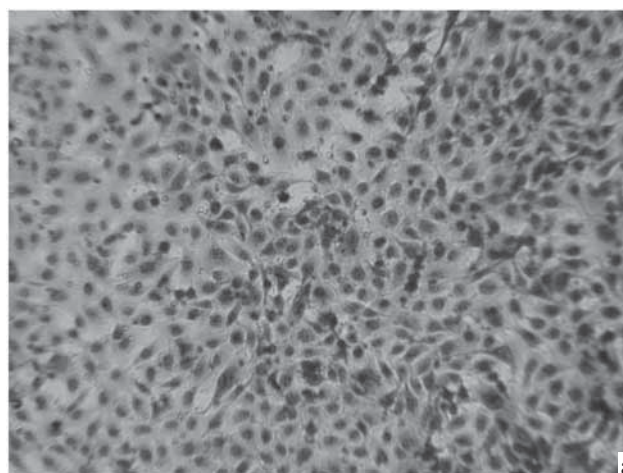


Рис. 5. Микрофотографии опухолевых клеток фибросаркомы человека на внутренней поверхности полупроницаемой мембраны после проведения инвазивного теста: А-контроль; В-клетки, инкубированные с иломастатом (25 мкМ)

наз — протеолитических ферментов, играющих важную роль в процессе опухолевой инвазии.

3. Тест-система может быть использована для рационального поиска новых потенциальных ингибиторов метастазирования с патогенетической направленностью действия. Кроме того, данные, полученные с применением инвазивного теста, могут быть полезны для корректировки терапевтических схем применения препаратов в качестве ингибиторов метастазирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albini A., Iwamoto Y., Kleinman H. K. et al.* A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells // *Cancer Res.* — 1987. — Vol. 47. — P.3239–3245.
2. *Albini A.* Tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. The matrigel chemoinvasion assay as a tool for dissecting molecular mechanisms // *Pathol Oncol Res.* — 1998. — Vol. 4. — P. 230–241.
3. *Armstrong P. B., Armstrong M. T.* Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role

for fibronectin // *Biochim Biophys Acta*. — 2000. — Vol. 27. — P. 9–20.

4. *Atkinson S. J., English J. L., Holway N., Murphy G.* Cellular cholesterol regulates MT1 MMP dependent activation of MMP 2 via MEK-1 in HT1080 fibrosarcoma cells // *FEBS Lett*. — 2004. — Vol. 21. — P. 65–70.

5. *Berndt A., Hyckel P., Konneker A. et al.* Oral squamous cell carcinoma invasion is associated with a laminin-5 matrix reorganization but independent of basement membrane and hemidesmosome formation. clues from an in vitro invasion model // *Invasion Metastasis*. — 1997. — Vol. 17. — P. 251–258.

6. *Cha H.J., Bae S.K., Lee H.Y. et al.* Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells // *Cancer Res*. — 1996. — Vol. 15. — P. 2281–2284.

7. *Erdel M., Speiss E., Trifz G. et al.* Cell interactions and motility in human lung tumor cell lines HS-24 and SB-3 under the influence of extracellular matrix components and protease inhibitors // *Anticancer Res*. — 1992. — Vol. 12. — P. 349–360.

8. *Galaray R. E., Cassabonne M. E., Giese C. et al.* Low molecular weight inhibitors in corneal ulceration // *Ann. NY. Acad. Sci.* — 1994. — Vol. 732. — P. 315–323.

9. *Grotendorst G.* Spectrophotometric assay for the quantitation of cell migration in the Boyden chamber chemotaxis assay // *Methods Enzymol*. — 1987. — Vol. 147. — P. 144–152.

10. *Hendrix M. J. C., Seftor E. A., Seftor R. E. B. et al.* Comparison of tumor cell invasion assay: human amnion verus reconstituted basement membrane barrier // *Invasion Metastasis*. — 1989. — Vol. 9. — P. 278–297.

11. *Kleinman H. K., McGarvey M. L., Hassell J. R. et al.* Basement membranes complexes with biological activity // *Biochemistry*. — 1986. — Vol. 25. — P. 312–318.

12. *Nabeshima K., Kataoka H., Koita H. et al.* A new long-term in vitro invasion assay using fibrous connective tissue matrices maintaining architectural characteristics of connective tissue // *Invasion Metastasis*. — 1988. — Vol. 8. — P. 301–316.

13. *Noe V., Willems J., Vandekerckhove J. et al.* Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin containing peptides // *J. Cell. Sci.* — 1999. — Vol. 112. — P. 127–135.

14. *Poste G., Fidler I. J.* The pathogenesis of cancer metastasis // *Nature*. — 1980. — Vol. 283. — P. 139–146.

15. *Siewverts A. M., Klijn J. G., Foekens J. A.* Assessment of the invasive potential of human gynecological tumor cell lines with the in vitro Boyden chamber assay: influences of the ability of cells to migrate through the filter membrane // *Clin Exp Metastasis*. — 1997. — Vol. 15. — P. 53–62.

16. *Yan C., Han R.* Effects of genistein on invasion and matrix metalloproteinase activities of HT1080 human fibrosarcoma cells // *Chin Med Sci J.* — 1999. — Vol. 14. — P. 129–133.

Поступила 20.02.2006.

УДК 579.81:615.831.011:616-092.4/.9

*I. G. Meerovich¹, M. A. Grin², G. A. Meerovich³, A. G. Tsyprovskiy², O. A. Mass²,
A. V. Zhurov², S. V. Barkanova⁴, L. M. Borisova¹, N. A. Oborotova¹, V. B. Loschenov³,
A. Yu. Baryshnikov¹, A. F. Mironov²*

NEW PHOTOSENSITIZERS OF NEAR-IR RADIATION RANGE BASED ON BACTERIOCHLORIN P : PRELIMINARY IN VIVO INVESTIGATION RESULTS

¹*N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow*
²*M. V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology,*
³*A. M. Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow*
⁴*State Research Center "NIOPIK", Moscow*

ABSTRACT

The article presents the results of preliminary investigations of some derivatives of bacteriochlorin p as potential photosensitizers for photodynamic therapy. It is shown that these photosensitizers possess considerable absorption in the range of minimum intrinsic absorption of biological tissue, quickly clear from skin and show high photodynamic activity.

Key words: photosensitizer, bacteriochlorin, absorption, fluorescence, photodynamic therapy.

*И. Г. Меерович¹, М. А. Грин², Г. А. Меерович³, А. Г. Ципровский², О. А. Масс²,
А. В. Журов², С. В. Барканова⁴, Л. М. Борисова¹, Н. А. Оборотова¹, В. Б. Лощенов²,
А. Ю. Барышников¹, А. Ф. Миронов²*

НОВЫЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ БАКТЕРИОХЛОРИНА Р: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ *IN VIVO*

¹*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*
²*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова*
³*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва*
⁴*ФГУП "Государственный научный центр "НИОПИК", Москва*

РЕЗЮМЕ

Приведены результаты предварительных исследований некоторых производных бактериохлорина р в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Показано, что эти фотосенсибилизаторы обладают интенсивным поглощением в области максимальной прозрачности биологической ткани, быстрым выведением из кожи и высокой фотодинамической активностью.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, бактериохлорин, поглощение, флюоресценция, фотодинамическая терапия.

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшей характеристикой фотосенсибилизаторов (ФС) наряду с высокой фотодинамической эффективностью и флюоресцентной способностью является спектральный диапазон оптического поглощения.

Прежде всего, чем больше глубина проникновения в биологическую ткань света с длиной волны, соответствующей спектральному максимуму поглощения фо-

тосенсибилизатора в ткани, тем большей может быть глубина фотодинамического воздействия. Наибольшую глубину могут обеспечить фотосенсибилизаторы с длиной волны спектрального максимума в диапазоне 720–850 нм [3], в котором собственное поглощение не-сенсibilizированной ткани минимально. Этот же диапазон имеет преимущество при ФДТ пигментированных новообразований, в частности, меланомы. Немало-

важно и то, что в этом диапазоне есть доступные и недорогие источники света, в первую очередь, полупроводниковые лазерные диоды.

Перспективным классом соединений для создания фотосенсибилизаторов ближнего инфракрасного диапазона являются производные бактериохлорофиллов [1-7].

Целью настоящей работы были предварительные исследования *in vivo* отечественных фотосенсибилизаторов на основе производных соединений бактериохлорофилла *a*, выделенного экстракцией из пурпурных бактерий *Rhodobacter capsulatus* [1; 4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проводились исследования *in vivo* тринатриевой соли бактериохлорофилла *a* (Bchl_a), метилового эфира оксима N-метоксициклоимида бактериохлорофилла *a* (Bchl_aOx-OMe) и тринатриевой соли 3-деацетил-3-(α-гидроксиэтил)-бактериохлорофилла *a* (Bchl_a-OH), структурные формулы которых представлены на рис. 1. Соединения были получены химической модификацией бактериохлорофилла *a*, выделенного экстракцией из пурпурных бактерий *Rhodobacter capsulatus* [1; 4].

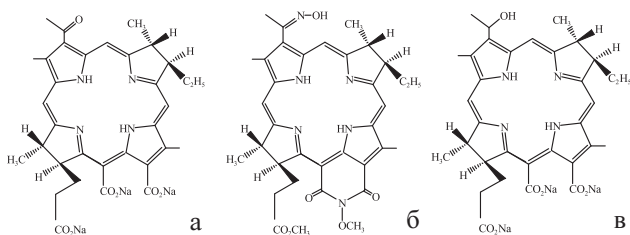


Рис. 1. Структурные формулы фотосенсибилизаторов:

- а — бактериохлорофилл *a*, тринатриевая соль;
- б — метиловый эфир оксима N-метоксициклоимида бактериохлорофилла *a*;
- в — 3-деацетил-3-(α-гидроксиэтил)бактериохлорофилл *a*, тринатриевая соль

Исследования проводились на мышах F₁ с опухолью Эрлиха (ELD), перевитой внутримышечно в область голени. Все ФС вводились внутривенно однократно на 5-й день после перевивки, когда объем опухоли (вычисляемый как

$$\frac{a \times b \times c}{2},$$

где *a*, *b*, *c* — размер опухоли по 3 ортогональным измерениям) достигал 0,7-0,8 см³.

Bchl_a и Bchl_a-OH вводились в водном растворе в дозах 20 и 4 мг/кг веса тела соответственно. Bchl_aOx-OMe из-за его ограниченной растворимости в воде вводился в виде кремоформной дисперсии в дозе 1 мг/кг веса тела.

Уровень накопления ФС в опухоли и коже, а также селективность накопления ФС в опухоли по отношению к коже оценивали *in vivo* в динамике по интенсивностям поглощения и флуоресценции ФС в тканях, определяемым с помощью оптоволоконного спектроанализатора ЛЭСА-01-Биоспек («Биоспек», Москва) [8].

При проведении ФДТ опухоли сенсibilизированных животных облучали оптическим излучением с плотностью мощности около 300 мВт/см². Длина волны излучения соответствовала спектральному максимуму поглощения введенного ФС. Для облучения использовались лазеры ЛФД-01-730 с длиной волны 732 нм и ЛФД-01-800 с длиной волны 795 нм, а также ламповый источник света ЛИ-ФДТ-06 с перестраиваемым узкополосным фильтром (для облучения на длине волны 760 нм).

Эффективность фотодинамического воздействия оценивалась по торможению роста опухолей (ТРО, %) после ФДТ по отношению к контрольной группе животных по формуле:

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

где *V_k* — средний объем опухоли в контрольной группе (см³);

V_o — средний объем опухоли в опытной группе (см³).

Опытные группы формировали из 5-6, контрольную группу — из 8 мышей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые ФС обладали значительным поглощением в спектральной области минимального собственного поглощения биоткани (рис. 2). Спектральные максимумы поглощения Bchl_a, Bchl_aOx-OMe и Bchl_a-OH имели длины волн соответственно 759; 795 и 735 нм.

Все изучавшиеся ФС флуоресцировали в растворах, однако при исследованиях *in vivo* только Bchl_a в биологической ткани имел достаточно интен-

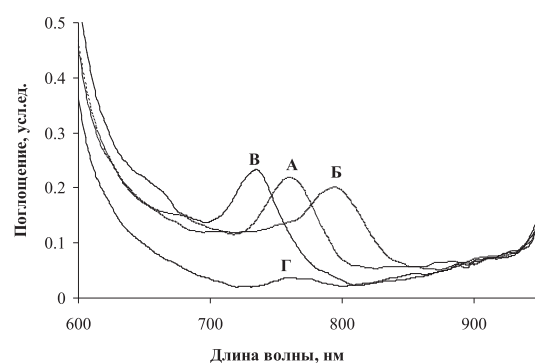


Рис. 2. Спектры поглощения биологической ткани, сенсibilизированной:

А — тринатриевой солью бактериохлорофилла *a* (Bchl_a);

Б — метиловым эфиром оксима N-метоксициклоимида бактериохлорофилла *a* (Bchl_aOx-OMe);

В — тринатриевой солью 3-деацетил-3-(α-гидроксиэтил)-бактериохлорофилла *a*, (Bchl_a-OH).

Г — спектр собственного поглощения несенсibilизированной опухоли

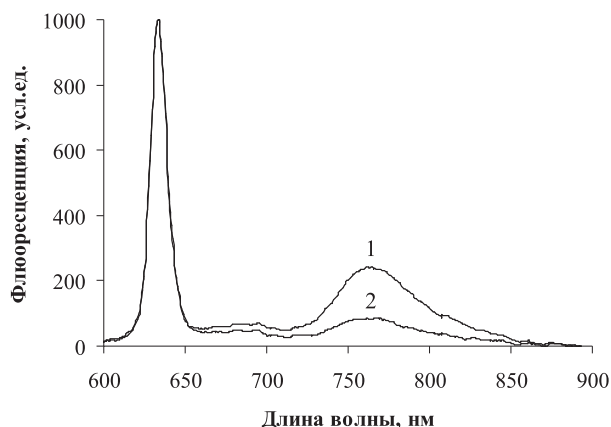


Рис. 3. Спектры флуоресценции опухоли (1) и нормальной ткани (2), сенсibilизированных тринатриевой солью бактериохлорина р (Vchlр), введенной внутривенно в дозе 20 мг/кг за 20 мин до измерения

сивную полосу флуоресценции с максимумом около 762 нм (рис. 3).

Динамику и селективность накопления VchlрОх-ОМе и Vchlр-ОН оценивали по интенсивности их поглощения в биологической ткани. Для Vchlр этот подход не давал достаточной точности из-за того, что спектр поглощения этого ФС накладывается на спектр поглощения деоксигемоглобина, интенсивность которого в опухолях достаточно велика из-за их гипоксии (рис. 2, спектр Г, полоса 740-780 нм) и может меняться в процессе эксперимента. Поэтому динамику и селективность накопления Vchlр оценивали по интенсивности его флуоресценции.

Исследования показали, что в коже мышей содержание всех фотосенсибилизаторов быстро (менее, чем за 2 сут) спадает до предела обнаружения (рис. 4). В опухолях мышей высокое содержание Vchlр и VchlрОх-ОМе наблюдается во временном интервале 10–80 мин после введения этих ФС, а Vchlр-ОН — в интервале 5–25 мин после его введения. Максимальное значение индекса селективности накопления Vchlр в опухоли по сравнению с кожей во временном интервале, соответствующем его высокому содержанию в опухоли, составляет 3–5. Для Vchlр-ОН и VchlрОх-ОМе значения этого параметра в соответствующих им временных интервалах лежат в пределах 1,2–1,6.

Облучение проводили в течение временных интервалов, когда накопление ФС в опухоли было близко к максимальному. Опухоли животных, сенсibilизированных Vchlр-ОН, облучали во временном интервале 10–25 мин после введения этого ФС, доза облучения составляла примерно 260 Дж/см². При использовании Vchlр и VchlрОх-ОМе облучение начинали через 10–30 мин после введения каждого из этих ФС и проводили в течение 20 мин, доза облучения при этом составляла 360 Дж/см².

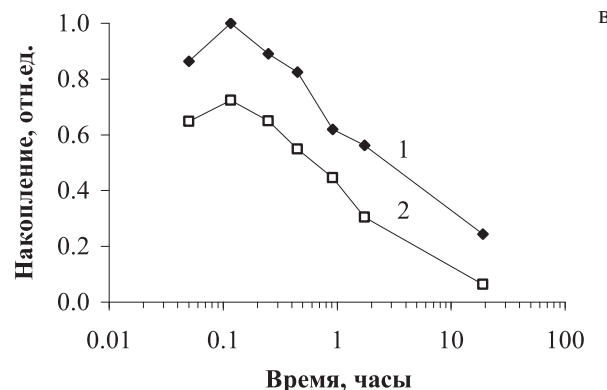
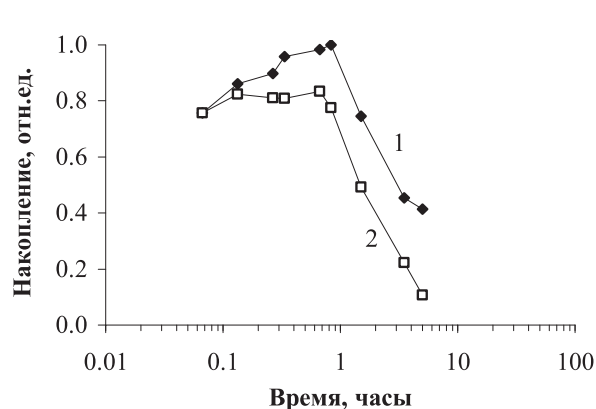
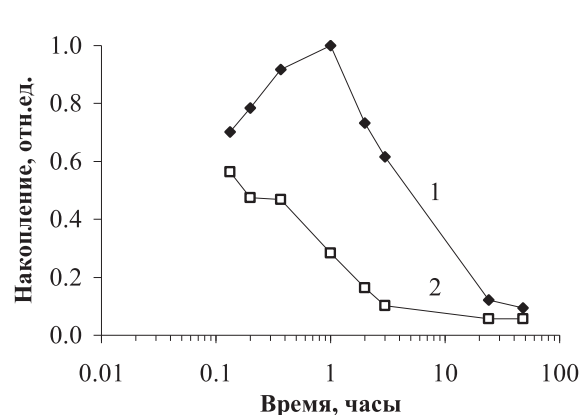


Рис. 4. Динамика накопления ФС в опухоли (1) и коже (2) мыши при внутривенном введении изучаемых производных бактериохлорина р:

- а — Vchlр в водном растворе в дозе 20 мг/кг;
- б — VchlрОх-ОМе в кремоформной дисперсии в дозе 10 мг/кг;
- в — Vchlр-ОН в водном растворе в дозе 4 мг/кг

Облучение приводило к деоксигенации облучаемой зоны опухоли и частичному фотобликингу фотосенсибилизаторов.

Торможение роста опухоли при ФДТ с VchlрОх-ОМе и Vchlр превышало 70 % и 80 % соответственно, при ФДТ с Vchlр-ОН достигало 60 % (рис. 5).

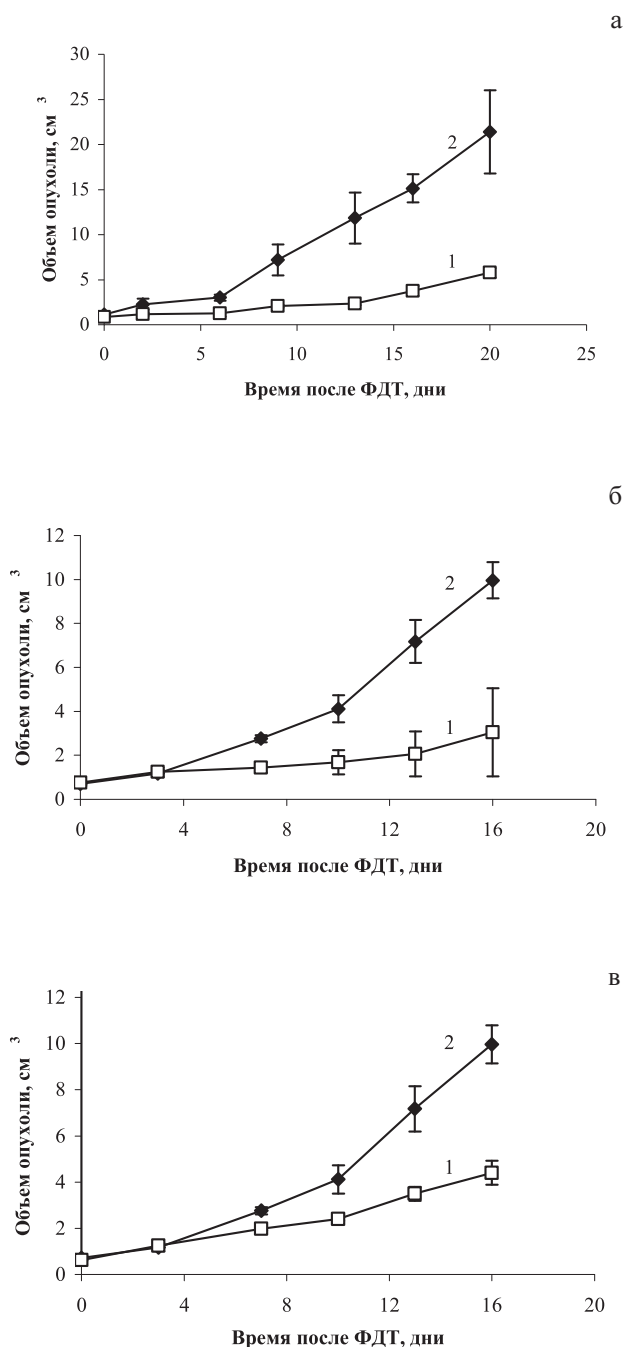


Рис. 5. Рост опухоли Эрлиха после ФДТ с различными фотосенсибилизаторами (1) по сравнению с контрольной группой (2):

а — Vchl_p введен в виде водного раствора в дозе 20 мг/кг; облучение ламповым источником с максимумом на длине волны 760 нм и плотностью мощности 300 мВт/см² в течение 20 мин;

б — Vchl_pOx-OMe введен в кремоформной дисперсии в дозе 1 мг/мл; облучение лазером с длиной волны 795 нм и плотностью мощности 300 мВт/см² в течение 20 мин;

в — Vchl_p-OH введен в виде водного раствора в дозе 4 мг/мл; облучение лазером с длиной волны 732 нм и плотностью мощности 280-300 мВт/см² в течение 15 мин

ВЫВОДЫ

Предварительные исследования показывают достаточно высокую фотодинамическую эффективность изучаемых соединений и потенциальную возможность их использования в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ.

Работа поддержана грантом президента Российской Федерации для молодых ученых — кандидатов наук МК-6258.2006.4

ЛИТЕРАТУРА

1. Миронов А. Ф., Грин М. А., Ципровский А. Г. и др. Разработка новых фотосенсибилизаторов бактериохлороинового ряда для фотодинамической терапии рака // Биоорганическая химия. — 2003. — Т. 29, № 2. — С. 214–221.

2. Henderson B. W., Sumlin A. B., Owczarczak B. L., Dougherty T. J. Bacteriochlorophyll-*a* as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors // J. Photochem. Photobiol., B.: Biol. — 1991. — Vol. 10, N. 6. — P. 303–312.

3. Meerovich I. G., Kubasova I. Yu., Oborotova N. A. et al. Fluorescent and photodynamic properties of infrared photosensitizer bacteriochlorophyllide-serine // Current Research on Laser Use in Oncology: 2000-2004. Proc. SPIE. — 2005. — Vol. 5973. — P. 59730G1–G11.

4. Mironov A. F., Grin M. A., Tsiprovskiy A. G. et al. New bacteriochlorin derivatives with a fused N-aminoimide ring // Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. — 2003. — Vol. 7. — P. 725–730.

5. Pandey K., Shiau F.-Y., Daugherty T. J., Smith K. M. Synthesis of new Bacteriochlorins and their Antitumor Activity // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 1994. — Vol. 4, N. 10. — P. 1253–1257.

6. Rosenbach-Belkin V., Chen L., Feodor L. et al. Serine conjugates of chlorophyll and bacteriochlorophyll: photocytotoxicity in vitro and tissue distribution in mice bearing melanoma tumors // Photochem. Photobiol. — 1996. — Vol. 64, N. 1. — P. 174–181.

7. Sharonov G. V., Karmakova T. A., Kassies R. et al. Cycloimide bacteriochlorin *p* derivatives: Photodynamic properties and cellular and tissue distribution // Free Radical Biology & Medicine. — 2006. — Vol. 40. — P. 407–419.

8. Stratonnikov A. A., Ermishova N. V., Meerovich G. A. et al. Simultaneous measurement of photosensitizer absorption and fluorescence in patients undergoing photodynamic therapy // Proc. SPIE. — 2002. — Vol. 4613. — P. 162–173.

Поступила 11.04.2006.

УДК 616.314.13-073.524:535.37:546.621/623

*S. Yu. Vasilchenko¹, A. I. Volkova¹, S. B. Korovin¹, V. B. Loschenov¹,
M. L. Sinyayeva², Ad. A. Mamedov², E. A. Luk`yanets³, S. G. Kuzmin⁴*

INVESTIGATION OF ALUMINIUM PHTHALOCYANINE NANOPARTICLES FLUORESCENCE PROPERTIES IN TOOTH ENAMEL MICRODAMAGES

*¹NSC GPI RAS, Moscow
²I. M. Setchenov MMA, Moscow
³SRC "NIOPIK", Moscow
⁴ISCC "Intermedbiophyschim", Moscow*

ABSTRACT

The possibility of fluorescence diagnostics application of tooth enamel microdamages with the use of water-insoluble aluminium phthalocyanine nanoparticles was studied. The investigation of aluminium phthalocyanine fluorescence intensity increasing in enamel microdamages has been carried out. The effect of aluminium phthalocyanine fluorescence enhancement in tooth microdamages was found out.

Key words: fluorescence diagnostics, fluorescence, tooth enamel, nanoparticles, aluminium phthalocyanine.

*С. Ю. Васильченко¹, А. И. Волкова¹, С. Б. Коровин¹, В. Б. Лощенов¹,
М. Л. Синяева², Ад. А. Мамедов², Е. А. Лукьянец³, С. Г. Кузьмин⁴*

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ФТАЛОЦИАНИНА АЛЮМИНИЯ В МИКРОПОВРЕЖДЕНИЯХ ЭМАЛИ ЗУБА

*¹ЦЕНИ ИОФ РАН, Москва
²ММА им. И.М. Сеченова, Москва
³ФГУП "ГНЦ "НИОПИК", Москва
⁴ГУП "МНКЦ "Интермедбиофизхим", Москва*

РЕЗЮМЕ

Изучена возможность применения флюоресцентной диагностики микроповреждений эмали зуба с использованием наночастиц водонерастворимого фталоцианина алюминия. Проведено исследование динамики роста интенсивности флюоресценции фталоцианина алюминия в микроповреждениях эмали. Обнаружен эффект разгорания флюоресценции фталоцианина алюминия в микроповреждениях.

Ключевые слова: флюоресцентная диагностика, флюоресценция, эмаль зуба, наночастицы, фталоцианин алюминия.

ВВЕДЕНИЕ

Диагностика микроповреждений эмали зуба имеет большое значение в современной стоматологии для предупреждения развития кариеса, т. к. зачастую именно такие микроповреждения являются предшественниками кариеса.

Минеральную основу эмали составляют кристаллы апатитов — гидроксапатита (до 75 %), карбонапатита, фтороapatита, хлороapatита и др., которые, в свою очередь, формируют более крупные структурные об-

разования, т.н. эмалевые призмы. Микроповреждения эмали характеризуется изменением состава, формы, размеров и взаимной ориентации кристаллов апатитов [1].

В современной клинической стоматологии используют следующие методы диагностики раннего кариеса и повреждений эмали зуба: визуальный осмотр полости рта, зондирование, витальное окрашивание эмали специальными красителями, такими, как метиленовый синий. Но эти методы не предназначены для

диагностики микроповреждений эмали, а способны выявить лишь повреждения достаточно больших размеров или кариес в стадии «белого пятна». К существенным недостаткам методов можно отнести также субъективность и отсутствие количественной оценки результатов.

Исходя из того, что в микроповреждениях эмали накапливается патологическая микрофлора, можно проводить аутофлуоресцентную диагностику, преимуществом которой является возможность количественной оценки. Однако поскольку естественные флуоресцентные свойства микрофлоры выражены, как правило, слабо, этот метод оправдывает себя лишь в случаях достаточно большого количества микрофлоры в микроповреждении и часто не дает возможности точной диагностики. Для решения этой проблемы в качестве маркеров для обнаружения патологически измененных участков поверхности зуба было предложено использовать другие естественные или синтетические флуорофоры, имеющие более высокую эффективность флуоресценции [3; 4].

Целью настоящего исследования было изучение возможности применения флуоресцентной диагностики микроповреждений эмали зуба с использованием в качестве маркера наночастиц водонерастворимого фталоцианина алюминия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Взвесь водонерастворимого фталоцианина алюминия, размеры кристаллов которого составляли 0,1–200 мкм, подвергали ультразвуковой диспергации (15 мин, мощность 70 Вт). Размеры полученных наночастиц составляли 50–200 нм. Важно отметить, что ни взвесь фталоцианина алюминия, ни полученный коллоидный раствор наночастиц не флуоресцировали при возбуждении в красном диапазоне спектра, хотя в мономолекулярной форме, например, при использовании органических растворителей, эффективность флуоресценции этого вещества достаточно высока.

Для флуоресцентных измерений использован волоконно-оптический спектрометр LESA-01-«Biospec». Возбуждение флуоресценции осуществляли с помощью He-Ne лазера (длина волны излучения 632,8 нм). Подробно система описана в работе [2].

Для апробации метода использовались зубы различной групповой принадлежности, удаленные по клиническим показаниям. Сначала исследовали поверхность зуба с помощью оптического микроскопа для выявления участков с микротрещинами эмали и неповрежденной эмалью, затем измеряли спектры аутофлуоресценции выбранных участков. Далее коллоидный раствор наночастиц ватным тампоном втирали в эмаль зуба в течение 15 с, после чего измеряли спектры флуоресценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первая часть эксперимента выполнена на удаленных зубах. На рис. 1 представлены спектры аутофлуоресценции. Видно, что интенсивность аутофлуорес-

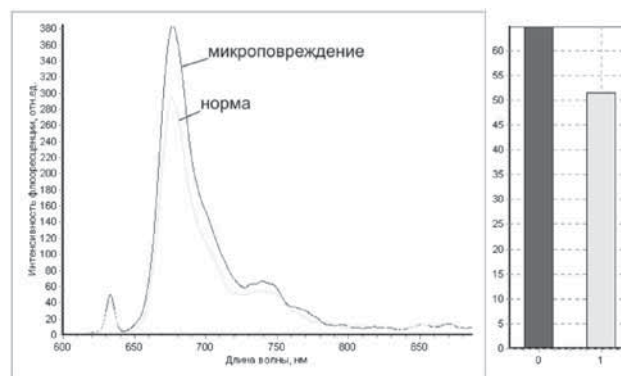


Рис. 1. Спектры аутофлуоресценции, измеренные в зонах микроповреждения и неповрежденной эмали

ценции в зоне микроповреждения практически равна интенсивности флуоресценции в нормальной зоне.

На рис. 2 видны спектры флуоресценции, измеренные непосредственно после нанесения наночастиц. Отношение интенсивностей флуоресценции фталоцианина алюминия в зонах эмали с микроповреждениями и неповрежденной эмали равно 1,6.

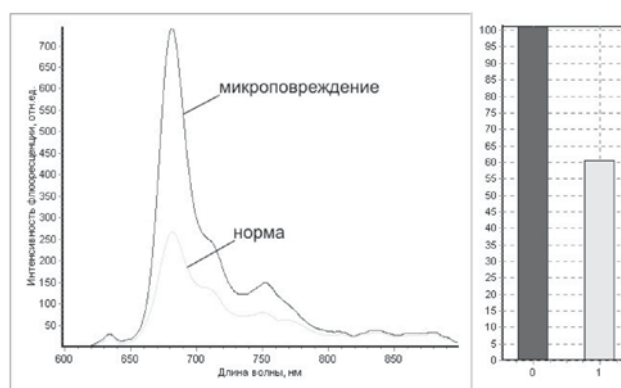


Рис. 2. Спектры флуоресценции, измеренные непосредственно после нанесения наночастиц

На рис. 3 показаны спектры флуоресценции, измеренные через 15 мин после нанесения наночастиц.

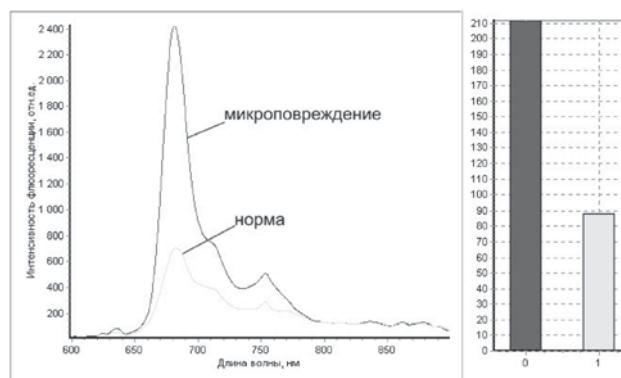


Рис. 3. Флуоресценции, измеренные через 15 мин после нанесения наночастиц

Видно значительное увеличение флюоресценции в зоне микроповреждения; в зоне неповрежденной эмали также увеличилась интенсивность флюоресценции, но гораздо меньше, так что отношение интенсивностей флюоресценции фталоцианина алюминия в зонах эмали с микроповреждениями и неповрежденной эмали составило 2,3.

Последнее измерение было произведено через 5 дней после нанесения наночастиц (рис. 4). Флюоресценция в зоне микроповреждения еще более увеличилась, увеличение в зоне неповрежденной эмали незначительно. Отношение интенсивностей флюоресценции фталоцианина алюминия в зонах эмали с микроповреждениями и неповрежденной эмали достигло 7,1.

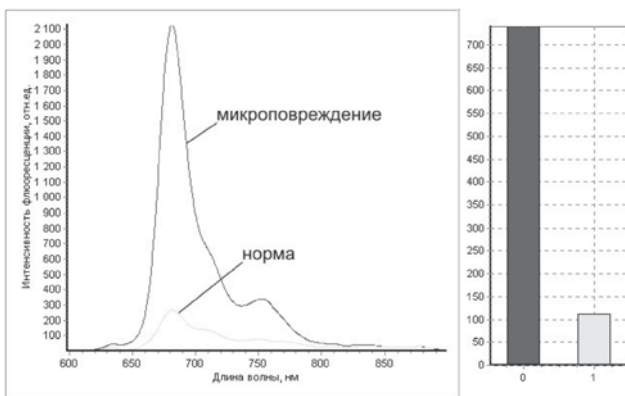


Рис. 4. Спектры флюоресценции, измеренные через 5 дней после нанесения наночастиц

Из обобщенных диаграмм по динамике роста флюоресценции (рис. 5) ясно, что за 5 дней флюоресценция в области микроповреждения увеличилась в 7,4 раз, в неповрежденном участке эмали — в 1,7 раз.

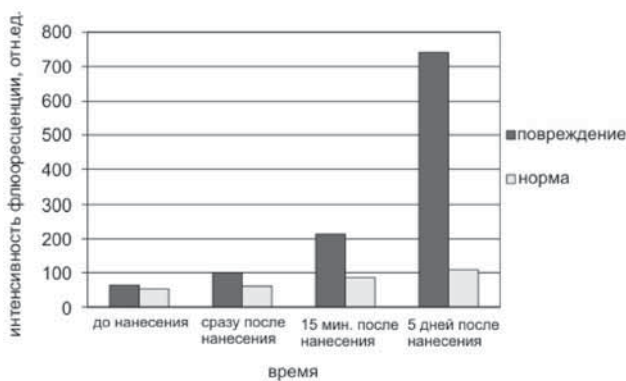


Рис. 5. Динамика повышения интенсивности флюоресценции фталоцианина алюминия в зонах эмали с микроповреждениями и неповрежденной эмали

Для выяснения того, необходимо ли использование фталоцианина алюминия именно в виде наночастиц, был проведен эксперимент по нанесению на поверхность зуба взвеси фталоцианина алюминия (размер кристаллов 0,1–200 мкм), которая использовалась

нами как исходное соединение для приготовления наночастиц. Измерения были проведены через 15 мин после нанесения взвеси. Наблюдалась значительно более слабая, чем в случае использования наночастиц, флюоресценция, которая может быть связана с наличием во взвеси наноразмерной фракции фталоцианина алюминия. Отношение интенсивностей флюоресценции фталоцианина алюминия в зонах эмали с микроповреждениями и неповрежденной эмали (1,3) в данном случае также оказалось значительно ниже, чем при использовании наночастиц (2,3).

Проведены исследования *in vivo*. Пациенту на поверхность зуба наносили коллоидный раствор наночастиц и через 15 мин измеряли спектры флюоресценции. На рис. 6 представлены спектры флюоресценции, измеренные в ходе эксперимента. Значительного увеличения интенсивности флюоресценции с течением времени в данном случае не наблюдается, т. к. наночастицы вымываются слюной и уже через 40 мин практически не детектируются, однако достигаемого через 15 мин значения отношения интенсивностей флюоресценции фталоцианина алюминия в зонах эмали с микроповреждениями и неповрежденной эмали (1,9) достаточно для уверенной диагностики микроповреждений эмали.

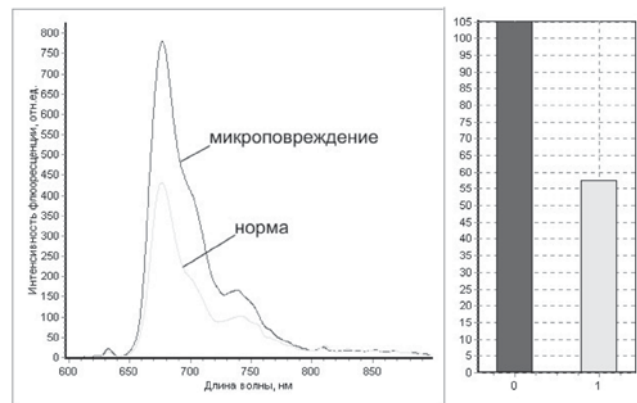


Рис. 6. Спектры флюоресценции, измеренные *in vivo* через 15 мин после нанесения наночастиц. Отношение интенсивностей флюоресценции фталоцианина алюминия в зонах эмали с микроповреждениями и неповрежденной эмали составляет 1,9

Возможны следующие механизмы, обеспечивающие увеличение интенсивности флюоресценции наночастиц фталоцианина алюминия в микроповреждениях эмали зуба. Микроповреждения эмали характеризуются увеличением пространства между эмалевыми призмами. Наночастицы после попадания в такие увеличенные межпризменные пространства удерживаются там в течение длительного времени ван-дер-ваальсовыми и/или ионными силами. Эти же силы вызывают отделение молекул фталоцианина алюминия от наночастиц, приводя тем самым к повышению интенсивности флюоресценции. Также возможно взаимодействие между наночастицами и различными органи-

ческими субстанциями, обладающими поверхностно-активными свойствами (полисахаридами, аминокислотами и др.), концентрация которых повышена в микроповреждениях эмали, что также приводит к отделению молекул фталоцианина алюминия и как следствие увеличивает интенсивность флюоресценции.

В пользу первого механизма свидетельствует появление и увеличение интенсивности флюоресценции раствора наночастиц фталоцианина алюминия при добавлении в него обладающих развитой поверхностью наночастиц гидроксиапатита размером 5-10 нм (данные не представлены).

Второй механизм подтверждается результатами экспериментов по исследованию оптических свойств коллоидного раствора наночастиц при добавлении в него поверхностно активных веществ (ПАВ): в спектре поглощения раствора при наличии ПАВ появляется характерный для фталоцианинов пик в красной области. Также наблюдалось появление флюоресценции раствора наночастиц при добавлении в него ПАВ.

Наиболее вероятно реализация двух описанных механизмов одновременно, однако и в том, и в другом случае необходимо, чтобы наночастицы проникали внутрь микроповреждения эмали зуба. Это объясняет значительно более низкую интенсивность флюоресценции при нанесении на поверхность зуба взвеси фталоцианина алюминия с размером кристаллов 0,1–200 мкм, чем в случае использования наночастиц фталоцианина алюминия размером 50-200 нм. Такая зависимость результатов от размеров используемых кристаллов фталоцианина алюминия, возможно, позволит, применяя наночастицы различных размеров, проводить дифференциальную диагностику различных стоматологических заболеваний, характеризующихся изменением структуры эмали.

Увеличение интенсивности флюоресценции вследствие включения наночастиц в метаболическую цепь микроорганизмов, присутствующих в микроповреждениях эмали, представляется маловероятным,

т. к. сравнение результатов, полученных при использовании удаленных зубов, подвергнутых антибактериальной обработке, и зубов, не прошедших таковую, не выявило существенных качественных и количественных различий между результатами.

ВЫВОДЫ

Изучены возможности применения флюоресцентной диагностики микроповреждений эмали зуба с использованием наночастиц водонерастворимого фталоцианина алюминия. Наблюдалось увеличение интенсивности флюоресценции фталоцианина алюминия в микроповреждениях эмали, что может быть использовано для диагностики микроповреждений. Показано, что наблюдаемые эффекты зависят от размеров используемых наночастиц фталоцианина алюминия, что, возможно, позволит, применяя наночастицы различных размеров, проводить дифференциальную диагностику различных стоматологических заболеваний, сопровождаемых изменением структуры эмали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровский Е. В., Леонтьев В. К. Биология полости рта. — М.: Медицина, 1991. — 304 с.
2. Лоценов В. Б., Стратоников А. А., Волкова А. И., Прохоров А. М. Портативная спектроскопическая система для флюоресцентной диагностики опухолей и контроля за фотодинамической терапией // Российский Химический Журнал. — 1998. — Т. XLII, № 5. — С. 50–53.
3. Loschenov V. B., Konov V. I., Prokhorov A. M. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostics // Laser Physics. — 2000. — Vol. 10, № 6. — P. 1188–1207.
4. Sinyaeva M. L., Mamedov Ad. A., Vasilchenko S. Yu. et al. Fluorescence Diagnostics in Dentistry // Laser Physics. — 2004. — Vol. 14, № 8. — P. 1132–1140.

Поступила 28.04.2006.

УДК 616.34/.35-006.6:615.37

*V. S. Ananyev, V. M. Kulushev, O. V. Korotkova, N. Yu. Zalit, E. V. Vardapetian***THE IMMUNOLOGICAL CORRECTION OF PATIENTS WITH COL-
ORECTAL CANCER AFTER TREATING WITH GALAVIT***N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow***ABSTRACT**

The article covers the results of surgical treating 83 patients with colorectal cancer admitted to the Proctology Department RCRS RAMS. The patients were shared between two groups: group 1 underwent a scheme-based immunotherapy by Galavit; group-2 was control group. A good tolerability of the drug was demonstrated and the immune-modeling effect produced by the drug on the immune-status parameters was detected in the patients of group 1 versus the controls. A reliable lower postoperative inflammatory complications in the patients, received Galavit were registered.

Key words: colorectal cancer, galavit, postoperative complications.

*V. S. Ананьев, В. М. Кулушев, О. В. Короткова, Н. Ю. Залит, Е. В. Варданян***ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ПРЕПАРАТОМ ГАЛАВИТ
БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ***ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва***РЕЗЮМЕ**

В статье представлены результаты хирургического лечения 83 больных колоректальным раком в отделении проктологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Были сформированы 2 группы пациентов. Больным 1-й группы проведена иммунотерапия препаратом Галавит по схеме, пациенты 2-й группы служили контролем. Показана хорошая переносимость препарата. Выявлено его иммуномодулирующее действие на показатели иммунного статуса пациентов 1-й группы по сравнению с контролем. Отмечено достоверное снижение частоты послеоперационных инфекционных осложнений у больных, получавших в комплексном лечении препарат Галавит.

Ключевые слова: колоректальный рак, Галавит, послеоперационные осложнения.

В последние годы во всех экономически развитых странах мира, в том числе и в нашей стране, растет заболеваемость раком толстой кишки. Ежегодно в мире регистрируются более 600 тыс. вновь заболевших, а накопленный контингент составляет более 3,5 млн. человек. В России рак толстой кишки занимает 3-е место среди всех онкологических заболеваний. При этом частота рака ободочной кишки составляет 11,6 среди мужчин и 9,2 среди женщин на 100 тыс. взрослого населения. Наибольшая заболеваемость отмечена у жителей Северо-Западного региона страны, наименьшая — в Восточных областях России. Чаще всего рак толстой кишки выявляется у лиц старше 50 лет, а 50 % пациентов составляют лица старше 60 лет. В известной мере этот факт обусловлен увеличением численности лиц пожилого и старческого возраста, преимущественно поражаемых злокачественными новообразованиями. Характерно и то, что в последние годы

наблюдается четкая перемена соотношения заболеваемости основными формами рака желудочно-кишечного тракта: рост заболеваемости колоректальным раком и снижение заболеваемости раком желудка. Так в 1990 г. в России число заболевших колоректальным раком было на 36,6 % меньше, чем больных раком желудка. В 1995 г. эта разница сократилась до 21,6 %. В 2000 г. число заболевших колоректальным раком превысило число заболевших раком желудка на 1,9 %. В Москве за последние 15 лет рак толстой кишки возрос с 10,2 до 17,2 на 100 тыс. взрослого населения. Более того, фактически в ближайшие годы рак толстой кишки в России будет ведущим среди опухолей желудочно-кишечного тракта, как это наблюдается в настоящее время в большинстве развитых стран мира. С 1998 г. в США колоректальный рак вышел на 1-е место, а в Европе на 2-е место после рака легкого у мужчин и рака молочной железы у женщин. Высокими

также остаются показатели смертности от колоректального рака. В мире ежегодно регистрируют более 440000 смертей, обусловленных раком ободочной и прямой кишки. В России смертность от колоректального рака занимает 3-е место в структуре смертности от всех злокачественных новообразований.

Лечение колоректального рака комплексное, индивидуально для каждого больного в зависимости от степени распространения опухоли, локализации новообразования, общего состояния и наличия осложнений опухолевого процесса.

В традиционной схеме лечения колоректального рака применяются следующие виды лечения [7; 8]: комбинированное и хирургическое, включающие в себя предоперационную дистанционную гамма-терапию с последующей операцией. В зависимости от степени распространения опухолевого процесса больным выполняются радикальные хирургические вмешательства, симптоматические (дренирующие) в виде разгрузочных стом для восстановления пассажа кишечного содержимого и паллиативные хирургические вмешательства, сопряженные с удалением первичной опухоли при наличии неудаляемых отдаленных метастазов и направленные на предупреждение развития в послеоперационном периоде таких осложнений, как кровотечение из распадающейся опухоли, перфорации, кишечной непроходимости и выделения раздражающих ткани продуктов распада опухоли, что улучшает качество жизни запущенных онкологических больных и создает реальные предпосылки для проведения различных схем и режимов химиотерапевтического лечения.

Основным видом лечения больных колоректальным раком все же является хирургический метод. Многие исследователи, изучающие отдаленные и непосредственные результаты хирургического и комбинированного лечения рака прямой и ободочной кишки, отмечают высокую частоту послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений, а также обусловленную этими осложнениями послеоперационную летальность.

Факторами, оказывающими неблагоприятное влияние на течение послеоперационного периода, являются различной степени выраженности метаболические и иммунологические нарушения, обусловленные как значительной степенью распространения опухолевого процесса, так и различными его осложнениями, наиболее частые из которых obturационная кишечная непроходимость и перифокальное воспаление. Частота подобных осложнений колеблется от 28 % до 56 %. Само хирургическое вмешательство является достаточно мощным стрессорным воздействием на организм больного, влияя на показатели гуморального и клеточного иммунитета и, естественно, на частоту послеоперационных осложнений воспалительной природы, ухудшая непосредственные результаты лечения. По мнению Т. И. Гришиной [2], практически при всех хирургических вмешательствах страдают основные компоненты иммунитета: Т-лимфоциты, фагоци-

тарные клетки, содержание и соотношение антител, система цитокинов. По мнению некоторых авторов [1], в 1-е сутки после операции уменьшается в крови содержание общего числа Т-лимфоцитов ($CD3^+$). Т. И. Гришина [2] отмечает, что соотношение $CD3^+ CD4^+$ и $CD3^+ CD8^+$ субпопуляций Т-клеток чаще всего не изменяется. При этом в ряде случаев при операциях у онкологических больных наблюдалось, напротив, увеличение числа Т-лимфоцитов.

Активное использование иммуномодуляторов началось еще в 70-е гг., когда было показано, что целый ряд различных препаратов способствует восстановлению иммунологических показателей пациентов. В последние годы активизировались поиски и создание новых иммуномодулирующих субстанций и созданных на их основе препаратов, направленных на усиление способности организма больного переносить агрессивное противоопухолевое лечение. Как отмечают многие исследователи, обычно иммуномодуляторы не проявляют прямого противоопухолевого и антиметастатического воздействия. Важную роль в неспецифическом иммунном ответе играют нейтрофилы, моноциты, макрофаги, высвобождающие медиаторы воспаления после контакта с микроорганизмами, что приводит к активации ряда гуморальных систем защиты и в дальнейшем к включению адаптивной реакции лимфоцитов, то есть формированию специфического иммунного ответа.

Использование препаратов, обладающих иммуномодулирующими свойствами, возможно на разных этапах лечения больного колоректальным раком. Принимая во внимание развитие вторичной иммунной недостаточности, обусловленной наличием в организме больного злокачественной опухоли, целесообразно применение иммунокорректоров с целью профилактики осложнений в до- и послеоперационном периоде. Длительность корректирующей терапии с применением иммунокорректоров (особенно у больных злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта) не должна ограничиваться только периодом пребывания больного в стационаре [3; 9; 10].

Цель настоящего исследования — изучение клинической эффективности отечественного иммуномодулирующего противовоспалительного препарата Галавит в комплексном лечении больных колоректальным раком.

Галавит — отечественный препарат — представляет собой 5-амино-1,-2,-3,-4-тетрагидрофтазазин-1,4-диона натриевую соль. В зависимости от способа и дозировок он способен как супрессировать избыточные проявления иммунного воспаления, так и повышать иммунную реакцию при недостаточной ее активности [2; 5; 8]. Предшествующие исследования установили, что препарат Галавит способен регулировать синтез цитокинов макрофагами; стимулировать фагоцитарную активность нейтрофилов при ее исходном дефиците; регулировать пролиферативную функцию Т-лимфоцитов и стимулировать активность натуральных киллеров.

Эффективность противовоспалительной терапии обусловлена способностью препарата уменьшать синтез TNF-фактора, ИЛ-1 и других цитокинов и острофазных белков гиперактивированных макрофагов [2; 4; 5]. Это достигается путем ингибирования макрофагами синтеза РНК, ДНК, цитокинов (на 6–8 ч) и одновременным усилением микрооцидной системы гранулоцитов, что предотвращает развитие патологического процесса. Препарат ингибирует гиперактивность макрофагов в легкой обратимой форме, оказывая ингибирующий эффект только на время применения. Галавит усиливает фагоцитоз и повышает неспецифическую резистентность организма к инфекционным заболеваниям, оказывает протективное действие на проявление токсемии, способствует противомикробной защите [4; 5]. По мнению Т. И. Гришиной [2], Р. М. Хаитова [7], выраженное противовоспалительное действие препарата весьма выгодно отличает его от стимуляторов иммунитета с частыми провоспалительными осложнениями и, с другой стороны, от нестероидных противовоспалительных препаратов и кортикостероидов с их многочисленными побочными эффектами.

Использование Галавита в курсовой дозе при комплексной терапии различных заболеваний, требующих включения иммуномодулирующей терапии, показало абсолютное отсутствие местных и общих побочных эффектов, а также аллергических реакций при его применении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основу работы положен анализ результатов лечения 83 больных раком толстой кишки, находившихся на лечении в клинике проктологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Контрольную группу составили 80 пациентов с различной локализацией колоректального рака. Исследуемая и контрольная группы были сопоставимы по возрастному показателю и характеру основной патологии.

Характер оперативного вмешательства определялся локализацией злокачественной опухоли и степенью распространения опухолевого процесса (табл. 1). В зависимости от степени распространения опухолевого процесса больным исследуемой группы проводилось либо комбинированное (с использованием предоперационной дистанционной гамма-терапии), либо чисто хирургическое (при наличии отдаленных метастазов) лечение.

Всем больным во время операции и в ближайшем послеоперационном периоде проводилась плановая антибактериальная терапия по принятым в отделении методикам, инфузионно-трансфузионная терапия, вводились антикоагулянтные и обезболивающие препараты.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ полученных данных позволил сделать вывод, что степень иммунодепрессии была более выраженной у больных с распространенным опухолевым процессом, что оказывало непосредственное влияние

Таблица 1

Характер оперативного вмешательства при раке толстой кишки

Характер оперативного вмешательства	+ ГАЛАВИТ (83 больных)		КОНТРОЛЬ (80 больных)	
	Абсолютное число	%	Абсолютное число	%
Экстирпация прямой кишки	16	19,3	18	23,7
Брюшно-анальная резекция	13	15,7	14	17,5
Чрезбрюшная резекция	11	13,3	7	8,75
Гемиколэктомия справа	14	16,8	14	17,5
Гемиколэктомия слева	12	14,5	11	13,8
Резекция сигмовидной кишки	13	15,7	10	12,5
Операция Гартмана	4	4,7	6	7,5
Всего:	83	100,0	80	100,0

на частоту и характер послеоперационной раневой инфекции.

Галавит в исследуемой группе больных раком толстой кишки применяли в пред- и послеоперационном периоде в дозе 0,1 г внутримышечно ежедневно. Продолжительность лечения составляла 18–25 дней. Наряду с общеклиническими методами и методиками больным проводились исследования гуморального и клеточного иммунитета, по показаниям микробиологические исследования. Динамика иммунологических показателей у больных исследуемой группы, изученная до и после применения Галавита, представлена в табл. 2.

Таблица 2

Показатели иммунограммы у больных РТК при использовании Галавита

Показатель	Здоровые доноры	До лечения Галавитом	После лечения Галавитом
Лейкоциты	5800–10000	6950	7250
Лимфоциты, %	19–37	26,7	24,6
Лимфоциты, абс.	1200–3000	1479,8	1637,4
CD3+ (Т-лимфоциты), %	60–75	62,7	64,5
CD 4+ (Т-хелп/инд), %	35–46	31,8	38,5
CD 5+ (Т-лимфоциты), %	60–80	67,6	68,4
CD 8+ (Т-супр/цит), %	25–30	26,1	25,8
CD 7+ (Т-лимф, NK), %	60–80	61,6	69,2
CD20+ (В-лимфоциты), %	5–15	7,8	13,4
CD38+ (актив. лимф.), %	24–40	28,1	39,5
CD16+ (NK-клетки), %	10–20	27,0	18,0
CD 25+ (рецептор ИЛ2), %	0–5	0,73	0,96
CD 50+ (мол. адгез.), %	85–100	94,4	93,9
Показатели гуморального иммунитета			
IgA, мг/мл	2,05–0,01	2,0	2,8
IgM, мг/мл	1,33–0,01	1,0	1,2
IgG, мг/мл	12,8–0,12	11,3	12,3

Эффективность профилактической терапии Галавитом оценивали в послеоперационном периоде перед выпиской больных из стационара. Анализ клинического течения заболевания в группе больных, которым в до- и послеоперационном периоде вводился Галавит, показал, что в более ранние сроки лечения (по сравнению с больными контрольной группы) улучшалось общее состояние больных, нормализовалась температур-

ная реакция, в анализах уменьшался палочкоядерный сдвиг формулы крови. При выписке больных из стационара анализ изменений Т-клеточного иммунитета указывал на выраженное иммунокорригирующее действие Галавита, заключающееся в достоверном увеличении показателей за счет CD3+, CD4+ клеток. Анализ течения послеоперационного периода у больных колоректальным раком свидетельствует об улучшении непосредственных результатов лечения. Так, частота послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений в группе больных, получавших Галавит, составила 10,8 % по сравнению с 28,8 % в контрольной группе. Характер и частота послеоперационных осложнений воспалительной природы в исследуемой группе больных и в контрольной группе представлены в табл. 3.

Таблица 3

Послеоперационные инфекционные осложнения при раке толстой кишки

Характер осложнений	+Галавит (83 больных)		Контроль (80 больных)	
	абс. число	%	абс. число	%
Раневая инфекция	1	1,2	7	8,7
Абсцесс, флегмона	2	2,4	5	6,2
Послеоперационный перитонит	—	—	1	1,3
Послеоперационная пневмония	1	1,2	3	3,8
Урологические осложнения	5	6,0	7	8,8
Всего	9	10,8	23	28,8

В группе больных раком прямой кишки, подвергнутых брюшно-промежностной экстирпации с тампонадой раны промежности, при динамическом цитологическом исследовании мазков из раны отмечено ускорение репаративных процессов, сокращение сроков гранулирования ран, заживающих вторичным натяжением. Влияние Галавита на течение послеоперационного периода выражалось также в значительном снижении общей интоксикации организма больного, уменьшении болевого синдрома, нормализации температурной реакции.

Резюмируя вышеизложенное, можно констатировать, что при применении Галавита для профилактики послеоперационных гнойно-септических осложнений отмечено полное отсутствие не только местных и общих побочных реакций, но и аллергических проявлений. Наряду с иммуномодулирующими свойствами отмечено выраженное противовоспалительное воздействие препарата, заключающееся в ускорении репаративных процессов в ране, нормализации температурной реакции, более ранней нормализации клинических и биохимических показателей крови.

Таким образом, проведенные исследования позволили сделать заключение о высокой клинической эффективности и безопасности применения иммуномодулирующего противовоспалительного препа-

рата Галавит в комплексном лечении ранних послеоперационных осложнений у больных колоректальным раком.

ВЫВОДЫ

1. Полученные данные являются предварительными, но они обнадеживают. Детальный анализ возможен при более многочисленном и продолжительном исследовании.
2. Анализ течения послеоперационного периода показал благотворное влияние Галавита на частоту и тяжесть послеоперационных инфекционных осложнений.
3. Благоприятное воздействие иммунокоррекции отмечено как в более быстрой нормализации общего состояния больных, так и в данных лабораторных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Винницкий Л. И., Бунатян К. А., Инвиева Е. В. Галавит в лечении послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у хирургических больных // IX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». — Тезисы докл. — М., 2002. — С. 84.
2. Гришина Т. И. Клиническое значение нарушения иммунитета при хирургических вмешательствах // Андрология и генитальная хирургия. — 2000. — № 2. — С. 35–38.
3. Галактионов В. Г. Иммунитет к опухолям / Иммунология. — М.: Изд-во Московского государственного университета, 1998. — С. 348.
4. Добрица В. П., Ботерашвили Н. М., Добрица Е. В. Современные иммуномодуляторы для практического применения. — СПб: Политехника, 2001. — 200 с.
5. Донцов В. И., Подколзин А. А. Галавит — новый иммуномодулятор с биоактивирующим и регенерирующим эффектом // Ежегодник Национального геронтологического центра — 2001. — Вып. 4 — С. 70–80.
6. Трапезников Н. Н., Шайн А. А. Онкология. — М.: Медицина, 1992. — 400 с.
7. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Изменение иммунитета при хирургических вмешательствах // Анналы хирургической гепатологии. — 1990. — т.3, №2. — С.100–110.
8. Черенков В. Г. Клиническая онкология. — М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. — 384 с.
9. Якубовская Р. И. Современные представления о молекулярных механизмах канцерогенеза и опухолевой прогрессии как основа для разработки новых методов терапии злокачественных новообразований // Российский онкологический журнал. — 2000. — № 6. — С. 42.
10. Ярилин А. А. Патология иммунной системы / Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1999. — С. 440–486.

Поступила 25.04.2006.

УДК 616.33-006.6-033.2:615.32

*S. V. Chulkova¹, O. A. Bocharova², A. A. Klimenkov², R. V. Karpova²,
A. I. Benevskiy¹, E. G. Gorozhanskaya²*

PHITOADAPTOGEN EFFICIENCY IN COMPLEX TREATMENT OF ADVANCED GASTRIC CANCER

¹*Russian State Medical University, Moscow*

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

ABSTRACT

Phytomix-40 (PhM-40) is a mixture of forty water-ethanol plant extracts including adaptogens. It was formulated to be effective biological response modifier for cancer patients. Animal models have revealed its low toxicity, anti-metastatic, immunomodulatory and antioxidant properties. In this study a comparative clinical analysis was performed to evaluate efficacy of PhM-40 administration to patients with far-advanced gastric cancer under different schemes of treatment. Patients and methods: The patients with gastric adenocarcinoma were given palliative surgery (3-rd group, n = 16 pts) or surgery + ELF polychemotherapy (1-st group, n = 19 pts) supplemented with PhM-40 administration (including 7 days before surgery). The control groups patients were only given operation (4-th group, n = 27 pts) or operation + ELF polychemotherapy (2-nd group, n = 20 pts). PhM-40 was taken orally. Results: PhM-40 administration resulted in a significant improvement of the immunity: an increase in the percentage of lymphoid cells expressing CD3, CD4, CD25, CD20, CD11b and CD16 receptors. PhM-40 also reduced cortisol and malondialdehyde blood serum content down to normal physiological level. Treatment with PhM-40 administration resulted in decreasing carbohydrate antigen 19-9 level. The life span was increased in 1, 3 groups (15,1 and 14,3 month respectively). No obvious effect was seen in 2, 4 groups (6,3 and 5,4 month respectively). Conclusion: The results suggest that administration of PhM-40 as biological response modifier to far-advanced gastric cancer patients is effective.

Key words: advanced gastric cancer, metastasis, palliative operations, phitoadaptogen, immunomodulation therapy.

*С. В. Чулкова¹, О. А. Бочарова², А. А. Клименков², Р. В. Карпова²,
А. И. Бенеvский¹, Э. Г. Горожанская²*

ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА ЖЕЛУДКА ФИТОАДАПТОГЕНОМ

¹*Российский государственный медицинский университет, Москва*

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

РЕЗЮМЕ

Комплексный препарат Фитомикс-40 (ФМ-40) разработан в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. В его состав входят 40 растительных экстрактов, включая адаптогены. Целью исследования явилась коррекция иммунобиологических показателей (иммунного и антиоксидантного статуса, уровня гормона кортизола и опухолеассоциированных маркеров) с помощью ФМ-40 и оценка его эффективности в комплексном лечении больных распространенным РЖ. В экспериментальных исследованиях показаны такие свойства ФМ-40, как практическая безвредность, антиоксидантная, антимагистатическая и иммуномодулирующая активность, радиопротекторный эффект.

Все больные были условно разделены на 4 группы. 1-я группа (опытная): 19 человек — больные РЖ, принимавшие ФМ-40 на протяжении основного лечения (операция + ПХТ), включая предоперационный период (7 дней). 2-я группа (контрольная): 20 человек - больные РЖ, не принимавшие ФМ-40 на протяжении основного лечения (операция + ПХТ). 3-я группа (опытная): 16 человек — больные РЖ, которым было выполнено только оперативное вмешательство, принимавшие ФМ-40. 4-я группа (контрольная): 27 человек — больные РЖ, которым было выполнено только оперативное вмешательство. В работе показано иммуномодулирующее, в том числе интерферогенное и адгезиогенное, а также антиоксидантное и антистрессорное действие ФМ-40 в

комплексном лечении больных распространенным РЖ. Средняя продолжительность жизни в 1-й группе (операция + ПХТ + ФМ-40) составила 14,3 мес (медиана выживаемости — 11 мес), в контрольной группе больных (2-й) — 5,4 мес. В 3-й группе средняя продолжительность жизни больных (перенесших операцию на фоне приема ФМ-40 без последующей полихимиотерапии) составила 15,1 мес (медиана выживаемости — 12 мес), в контрольной группе (4-й) — 6,3 мес.

Ключевые слова: рак желудка, метастазы, фитоадаптоген, иммуномодулирующая терапия, паллиативные операции.

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка в нашей стране занимает 2-е место у мужчин и 3-е у женщин: ежегодно заболевают 46 тыс. человек, а одногодичная летальность составляет 56 % [9]. Подавляющее большинство пациентов поступают на лечение с генерализованными формами опухолевого процесса, им выполняются паллиативные операции. Это отражается на отдаленных результатах лечения: 5 лет наблюдения переживают не более 5 % пациентов [10]. Продолжительность жизни больных распространенным РЖ, по данным разных авторов, составляет в среднем 4–6 мес [7; 12; 14; 23]. В лечении РЖ используются комбинации хирургического и химиотерапевтического методов. Несмотря на достигнутые успехи, эффект лечения нестойк, ремиссии кратковременны.

Исследования последних лет показали, что онкология нуждается в средствах, повышающих неспецифическую сопротивляемость организма, направленных на регуляцию стрессорного синдрома, вызванного современными методами лечения опухолевых заболеваний, уменьшение осложнений химиотерапии, улучшение качества жизни и ее продление после специфического лечения. В решении этой проблемы несомненный интерес представляют фитоадаптогены. Накоплен богатый экспериментальный и клинический материал, свидетельствующий о лечебно-профилактических свойствах отдельных адаптогенов в отношении онкологических заболеваний [15; 21]. Действие их направлено на различные защитные системы организма, в том числе на ослабление токсического влияния специфической терапии на организм и усиление ее антибластомной эффективности [8; 19; 20; 22]. Показано, что под влиянием адаптогенов на поверхности опухолевых клеток увеличивается экспрессия молекул адгезии, которые служат лигандами для эффекторов иммунитета, что в конечном итоге приводит к стимуляции иммунологической реактивности организма онкологического больного [6; 16; 24; 25].

Комплексный препарат Фитомикс-40 (ФМ-40) разработан в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. В его состав входят 40 растительных экстрактов, включая адаптогены. При изучении фитохимического состава ФМ-40 выявлено содержание широкого спектра биологически активных соединений, в том числе панаксозидов, аралозидов, элеутерозидов, флавоноидов, салидрозидов, схизандринина, арбутина, рутинина, глицирризиновой, урсоловой, олеаноловой кислот, бетулина, витаминов, полифенолов и др. В экспериментальных

исследованиях показаны такие свойства ФМ-40, как практическая безвредность [1], антиоксидантная [17], антиметастатическая и иммуномодулирующая активность [18], радиопротекторный эффект [2; 11]. При клиническом изучении показан высокий лечебный эффект в отношении доброкачественной гиперплазии предстательной железы у мужчин пожилого возраста и предракового заболевания — лейкоплакии слизистой оболочки полости рта, а также выявлены наиболее эффективные дозы применения ФМ-40 [3; 4; 5; 13]. Полученные эффекты коррелируют с иммуномодулирующим, в том числе интерферогенным и адгезиогенным, а также антиоксидантным, антимуtagenным и гормонотерапевтическим влиянием фитоадаптогена.

Цель исследования — коррекция иммунобиологических показателей (иммунного и антиоксидантного статуса, уровня гормона кортизола и опухолеассоциированных маркеров) с помощью ФМ-40 и оценка его эффективности в комплексном лечении больных распространенным РЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 82 больных с верифицированным диагнозом рак желудка в возрасте от 26 до 77 лет (средний возраст 59 лет). Диагноз был установлен на основании клинико-эндоскопических и гистологических исследований. Подавляющую часть новообразований желудка составляла аденокарцинома различной степени дифференцировки — 59 больных (72 %). Перстневидноклеточный рак отмечен в 20 случаях (24 %), на долю недифференцированного рака приходилось 3 случая (6 %).

Стадирование больных проводили по Международной классификации 2004 г. В исследовании преобладали пациенты, отнесенные к IV стадии заболевания, — 61 человек (76,88 %). У 19 больных (23,12 %) зарегистрирована IIIБ стадия, у 2 (2,44 %) — IIIА стадия. Наиболее часто встречалось тотальное поражение и поражение тела желудка — 40 % и 36 % соответственно. В 9 % случаев опухоль локализовалась в проксимальном отделе, в 15 % случаев — в антральном отделе желудка. В большинстве случаев больным была выполнена гастрэктомия — 27 (33 %), гастрэктомия со спленэктомией — 29 (36 %), комбинированные гастрэктомии — 17 (21 %) больным. Паллиативный характер операции у 57 (69,5 %) больных был обусловлен наличием отдаленных метастазов, у 10 (12,2 %) больных — прорастанием опухоли в соседние органы,

наличием опухолевых клеток по линии резекции у 15 (18,3 %) больных.

Распределение больных с отдаленными метастазами (57 человек) было следующим. Гематогенные метастазы наблюдались у 15 (26,4 %) больных, из них в сочетании с диссеминацией по брюшине — 1 (1,8 %), с ростом опухоли по линии резекции — 3 (5,6 %). Имплантационные метастазы и диссеминация по брюшине выявлялись у 29 (50,8 %) больных, причем в 5 (9,4 %) случаях линия резекции прошла в зоне роста опухоли. Отдаленные лимфогенные метастазы (в лимфоузлы брыжейки тонкой кишки, в левый надпочечный лимфоузел — метастаз Вирхова) обнаружены у 13 (22,8 %) больных.

Химиотерапию проводили 39 (47 %) больным по схеме ELF (5-Фторурацил 500 мг/м², внутривенно в 1-й, 2-й, 3-й дни; Этопозид 120 мг/м², внутривенно в 1-й, 2-й, 3-й дни; Лейковорин 300 мг/м², внутривенно в 1-й, 2-й, 3-й дни), курсы повторяли каждые 3 нед. Всего проведено 117 курсов.

Пациенты были условно разделены на 4 группы. Набор в группы проводился случайным образом. Группы были сопоставимы по полу, возрасту, распространенности опухолевого процесса.

1-я группа (опытная): 19 человек (23 %) — больные РЖ, принимавшие ФМ-40 на протяжении основного лечения (операция + ПХТ), включая предоперационный период (7 дней). 2-я группа (контрольная): 20 человек (25 %) — больные РЖ, не принимавшие ФМ-40 на протяжении основного лечения (операция + ПХТ). 3-я группа (опытная): 16 человек (20 %) — больные РЖ, которым было выполнено только оперативное вмешательство, принимавшие ФМ-40, включая пред- (7 дней) и послеоперационный периоды курсами. 4-я группа (контрольная): 27 человек (32 %) — больные РЖ, которым было выполнено только оперативное вмешательство, не принимавшие ФМ-40. Курс приема ФМ-40 составлял 1,5 мес в дозе 15 мл препарата (+ 5 мл воды) за 15-20 мин перед едой 3 раза в день. Перед проглатыванием рекомендуется держать во рту 3 мин. В среднем проводили 5-6 курсов. С каждым последующим курсом доза препарата увеличивалась на 5 мл в день.

Гормон кортизол, уровни опухолевых маркеров СА 19-9 и РЭА в сыворотке крови больных РЖ определяли иммуноферментным методом с использованием диагностических наборов фирм “Roche” и “Orion Diagnostics”.

Иммунный статус оценивали с использованием моноклональных антител (МКА) в непрямой реакции иммунофлюоресценции. Исследовали уровни экспрессии дифференцировочных антигенов CD3, CD4, CD8, CD16, CD20; активационных антигенов CD25, HLA-DR, CD95; молекул адгезии CD11b, CD18, CD50, CD54. Относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих исследуемые антигены, определяли на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson США) в гейте лимфоцитов.

Интерферогенную активность лимфоцитов определяли биологическим методом. Исследование

включало 2 ступени: количественную — определение уровня спонтанного интерферона (ИФН) и качественную — сравнение влияния разных препаратов ИФН, его индукторов и ФМ-40 на интерферогенез лимфоцитов *in vitro*, а также определение количества больных, лимфоциты крови которых отвечают продукцией ИФН на введение в систему указанных препаратов.

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по образованию окрашенного триметинового комплекса, содержащего 1 молекулу малонового диальдегида и 2 молекулы тиобарбитуровой кислоты; активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по восстановлению нитротетразолиевого синего в системе ксантин-ксантинооксидаза; активность каталазы оценивали по скорости утилизации перекиси водорода; содержание глутатиона определяли спектрофотометрически при 512 нм по реакции с 5,5 дитио-бис(2-нитробензойной кислотой); активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли также спектрофотометрически при длине волны 340 нм по скорости образования конъюгатов восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом по общепринятым методикам.

При анализе полученных цифровых данных использовали статистический пакет ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было изучено влияние Фитомикса-40 на интерферогенез лимфоцитов крови больных распространенным РЖ *in vitro*. Средний показатель титра спонтанно вырабатываемого ИФН лимфоцитами онкологических больных определен как 0,15±0,07 ед. (табл. 1). Исследуемые препараты, в том числе ФМ-40, индуцировали выработку ИФН лимфоцитами крови онкологических больных. Под влиянием таких индукторов ИФН, как ридостин, неовир, циклоферон, амиксин, показатель титра ИФН возрастал в среднем до 3 ед., что соответствует реальному разведению препарата в 8 раз. Под влиянием ФМ-40 показатель титра ИФН возрастал до 5,5 ед., что соответствует разведению препарата более, чем в 32 раза.

Таблица 1

Индукция интерферогенеза лимфоцитов больных распространенным раком желудка под влиянием различных препаратов *in vitro* (n = 17)

Препарат	Титр ИФН* (M±m)
Спонтанно вырабатываемый ИФН	0,15±0,07
Ридостин	2,65±0,14
Амиксин	3,10±0,12
Неовир	3,00±0,11
Циклоферон	2,95±0,13
Фитомикс-40 (развед. 1:10)	5,50±0,19
* Значения представлены в виде ед. log ₂ (титр ⁻¹).	

Сравнение количества больных, лимфоциты которых отвечали выработкой ИФН на введение фитоадаптогена, а также препаратов ИФН и его индукторов выявило, что только при добавлении ФМ-40 в систему *in vitro* лимфоциты больных вырабатывали ИФН в 100 %

случаев (табл. 2). Иными словами, все пациенты проявили чувствительность к ФМ-40. В случаях с другими препаратами часть больных оказалась устойчивой к их влиянию на интерферогенез лимфоцитов. Таким образом выявлено отсутствие индивидуальной резистентности больных РЖ к ФМ-40, что выгодно отличает данный препарат от индивидуальных фитоадаптогенов, для которых подобные проблемы являются ограничением широкого использования.

Таблица 2

Чувствительность лимфоцитов крови больных распространенным раком желудка к препаратам ИНФ и его индукторам *in vitro* (n = 17)

Препарат	Количество пациентов, лимфоциты крови которых отвечают выработкой ИФН на введение изучаемых препаратов <i>in vitro</i> , %
Реаферон	15
Лейкинферон	22
ЧЛИ	25
Интрон А	27
Роферон А	35
Гаммаферон	31
Ридостин	52
Неовир	46
Циклоферон	69
Амиксин	67
Фитомикс-40	100,0

Поскольку ФМ-40 не является препаратом, содержащим интерферон, полученные результаты могут свидетельствовать о способности ФМ-40 индуцировать синтез эндогенного интерферона и/или повышать чувствительность лимфоцитов к действию ИФН в организме человека. Таким образом, можно предположить, что ФМ-40 является неспецифическим индуктором интерферона.

Исследование иммунного статуса (табл. 3) выявило, что у большинства больных (70 %) значения практически всех иммунологических показателей находились ниже или едва достигали нижней границы нормы. Отмечено снижение следующих показателей: общего числа лимфоцитов (CD3⁺), хелперов-индукторов (CD4⁺), иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8), CD20⁺ лимфоцитов, CD11b⁺, CD16⁺ активированных клеток.

Иными словами, для данной выборки пациентов с III-IV стадией заболевания правомочно говорить об отклонениях различных звеньев иммунитета от физиологической нормы. Полученные результаты подтверждают данные литературы о снижении иммунореактивности организма онкологического больного на поздних стадиях развития заболевания. После применения ФМ-40 у большинства больных отмечена коррекция показателей иммунного статуса: увеличение числа CD3⁺ лимфоцитов, хелперов-индукторов (CD4⁺), CD20⁺ лимфоцитов, CD16⁺ клеток, норма-

Таблица 3

Иммунный статус больных распространенным раком желудка на фоне приема ФМ-40

Антиген	Норма, %	До операции M±m, n=27	После операции 10 сут M±m, n=27	После ПХТ M±m, n=14 группа №1	Через 4–5 мес после операции M±m, n=15 группа №3
CD3	60–75	51,9±2,9	60,7±1,6 p ₁ =0,005	64,6±2,6 p ₃ =0,026	66,4±1,8 p ₄ =0,031
CD4	35–46	30,5±2,2	32,1±1,8	42,1±2,1 p ₂ 0,04; p ₃ =0,036	42,6±0,8 p ₄ <0,001
CD8	25–30	27,9±2,1	26,2±1,5	27,1±2,1	27,0±1,5 p ₄ =0,728
CD4/ CD8	1,5–1,9	1,1±0,1	1,2±0,1	1,6±0,3 p ₂ <0,001; p ₃ <0,001	1,6±0,1 p ₄ =0,01
CD20	5–15	5,4±0,4	7,6±0,8 p ₁ =0,017	12,6±1,5 p ₂ =0,003; p ₃ <0,001	13,3±0,5 p ₄ <0,001
HLA-DR	7–15	8,1±0,8	8,7±0,8	11,5±1,1 p ₂ =0,050; p ₃ =0,027	12,4±0,9 p ₄ =0,011
CD16	10–20	10,5±0,9	12,2±1,2	20,4±2,0 p ₂ <0,001; p ₃ <0,001	20,2±0,9 p ₄ <0,001
CD11b	15–20	13,5±1,0	13,0±1,2	17,6±1,8 p ₂ =0,03; p ₃ =0,019	18,5±0,7 p ₄ =0,003
CD18	56–64	65,1±3,6	70,8±3,7	82,9±3,1 p ₂ =0,03; p ₃ =0,002	79,3±3,0 p ₄ =0,131
CD50	70–99	83,6±2,5	82,7±3,2	85,2±2,9	
CD54	9–15	10,4±2,1	14,3±2,5	14,9±2,4	
CD95	10–30	12,8±1,7	14,5±1,6	22,4±2,6 p ₂ =0,01; p ₃ =0,002	
CD25	0–5	1,8±0,4	3,6±0,5 p ₁ =0,010	4,5±0,6 p ₃ =0,002	

p₁ — достоверность различий до/после операции; p₂ — достоверность различий после операции/после ПХТ; p₃ — достоверность различий до операции/после ПХТ; p₄ — достоверность различий после операции/ через 4–5 мес. после приема ФМ-40.

лизация иммунорегуляторных взаимоотношений между субпопуляциями Т-лимфоцитов. Вместе с тем увеличилось содержание CD25⁺ активированных клеток. Выявлено также повышение числа клеток, экспрессирующих молекулы адгезии, — лейкоцитарные интегрин CD11b, CD18. У больных, в комплексном лечении которых не применялся ФМ-40 (группы контроля), подобной динамики иммунологических показателей не отмечено.

Таким образом, данный этап работы показал возможность нормализующего влияния фитоадаптогена на звенья клеточного, гуморального иммунитета и естественной резистентности у больных распространенным РЖ в процессе комплексного лечения.

Исследование антиоксидантного статуса у больных выявило, что содержание в сыворотке крови цитотоксического продукта липидной пероксидации малонового диальдегида повышено у 89 % пациентов (табл. 4). Вместе с тем отмечены высокий уровень глутатиона и повышенная активность супероксиддисмутазы (по верхней границе нормы). Это свидетельствует о нарушении регуляции процесса перекисного окисления липидов и преобладании прооксидантных процессов над антиоксидантными, а также приводит к развитию интоксикации организма, которая усугубляется на фоне проводимого лечения в контрольных группах. Применение ФМ-40 приводило к достоверному снижению уровня малонового диальдегида, что указывает на подавление перекисного окисления ли-

пидов. Вместе с тем поддержание высокого содержания глутатиона и понижение активности GST свидетельствуют о включении глутатионовой системы в детоксикационные процессы организма.

В контрольных группах наблюдали отрицательную динамику показателей, указывающую на дальнейшую активацию реакций перекисного окисления липидов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат ФМ-40 оказывает на организм детокси-

Таблица 4

Показатели антиоксидантного статуса больных распространенным раком желудка на фоне приема ФМ-40

Параметры	Норма	Результаты обследования (M±m)		
		До операции n=27	После операции n=27	После ПХТ n=14
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	4,28±0,12 (3–6)	5,7 ± 0,3	4,9 ± 0,3* (p = 0,026)	5,1 ± 0,4 (p = 0,460)
Супероксид-дисмутаза, Е/мл эр. мин	420±18 (380–450)	456,9± 11,2	489,2± 10,3* (p = 0,040)	430,6± 19,1 (p = 0,125)
Каталаза, Е/мл эр. мин	32,8±0,9 (20–40)	32,42±1,30	32,47±1,22	29,0±1,9
Глутатион, Мкмоль/мл эр.	1,69±0,12 (0,9–1,8)	2,17±0,09	2,03±0,10	2,1±0,30
Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/мл эр. *мин	1,37±0,06 (0,9–1,7)	1,35±0,07	1,42±0,05	1,25±0,26

*p — достоверность различий до/после операции

цирующее действие, снижая тем самым токсическое влияние проводимой ПХТ на организм.

При первичном обследовании средний уровень кортизола у больных распространенным РЖ был несколько выше верхней границы нормы (табл. 5). На фоне комплексного лечения с применением ФМ-40 удалось добиться снижения концентрации кортизола в сыворотке крови больных до физиологической нормы. Иными словами, ФМ-40 вызывал коррекцию высокого уровня кортизола, который отражает нарушения гомеостаза при стрессорных состояниях организма. В контрольных группах концентрация кортизола на фоне лечения не снизилась, более того, отмечено ее нарастание.

Исходная концентрация опухолеассоциированного антигена РЭА в крови была повышена у 42 % больных (табл. 6). После операции концентрация в сыворотке крови РЭА опытных групп снизилась у 59 % больных. По окончании комплексного лечения значение этого показателя у 50 % больных достигло еще большего снижения. По сравнению с исходными данными концентрация РЭА снизилась на 48 %, однако эти изменения были статистически не достоверны. Исходный уровень СА 19-9 был практически в 3 раза выше верхней границы нормы. У подавляющего большинства больных опытных групп (>80 %) концентра-

Таблица 5

Уровень кортизола в крови больных распространенным РЖ на фоне приема ФМ-40

Показатель	Результаты исследования		
	До операции (M±m) n=27	После операции (M±m) n=27	После ПХТ (M±m) n=14
Кортизол		560,9 ± 19,3 p ₁ = 0,004	430,8 ± 32,5 p ₂ = 0,342
Норма	130-750		

p₁ — достоверность различий до/после операции; p₂ — достоверность различий после операции/после ПХТ

Таблица 6

Уровень опухолеассоциированных антигенов РЭА, СА 19-9 в сыворотке крови больных распространенным РЖ на фоне приема ФМ-40

Показатель	Норма нг/мл	Результаты исследования		
		До операции (M±m) n=27	После операции (M±m) n=27	После ПХТ (M±m) n=14
РЭА			4,71 ± 1,2 p ₁ = 0,546	2,9 ± 0,44 p ₂ = 0,260
СА			18,3 ± 5,1 p ₁ = 0,047	16,2 ± 6,1 p ₂ = 0,631

p₁ — достоверность различий до/после операции; p₂ — достоверность различий после операции/после ПХТ

ция СА 19-9 в сыворотке крови после хирургического лечения достоверно снизилась, полученные результаты сохранялись после окончания полихимиотерапии. В контрольных группах на фоне проводимого лечения значения онкомаркеров РЭА и СА 19-9 в крови имели тенденцию к возрастанию. Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что ранее проведенные исследования ФМ-40 на линиях клеток человека (рак яичников, гипернефрома, рак шейки матки) выявили некоторое замедление скорости роста опухолевых клеток. Вместе с тем ФМ-40 не влиял на пролиферацию клеток почки эмбриона свиньи. На модели метастазирующей опухоли (карциномы Льюис) выявлено антиметастатическое действие ФМ-40 [6]. В клинических исследованиях оральной лейкоплакии также показано, что ФМ-40 инициировал коррекцию программы дифференцировки эпителиоцитов, восстанавливая адгезионные взаимодействия, способность к апоптозу, а также ослабляя ороговение и снижая количество незрелых клеток патологического очага [4]. У больных гиперплазией предстательной железы в том числе определено антимуtagenное действие ФМ-40, а также достоверное снижение уровня ПСА в сыворотке крови [5]. Вместе с тем в клинических исследованиях при использовании ФМ-40 в лечении оральной лейкоплакии и ДГПЖ выявлен интерферогенный эффект, который выражался в повышении продукции ИФН-α и ИФН-γ иммунными клетками больных. Принимая во внимание эти данные, мы предполагаем, что при использовании ФМ-40 можно достигнуть некоторого контроля роста опухоли, что приводит к снижению опухолевых маркеров и увеличению продолжительности

сти жизни больных. Кроме того, выявлена способность ФМ-40 повышать содержание лимфоцитов с экспрессией лейкоцитарных интегринов, что является показателем усиления активности эффекторов иммунитета и может приводить к стимуляции лизиса опухолевых клеток последними. Таким образом, ФМ-40 индуцирует провоспалительную стимуляцию, способствуя взаимодействию молекул из семейства ICAM с их лигандами, обеспечивающими прикрепление иммунных эффекторов к клеткам-мишеням, стимулируя тем самым элиминацию опухоли макрофагами, нейтрофилами, натуральными киллерами и цитотоксическими лимфоцитами.

Оценка клинической эффективности показала, что применение ФМ-40 в комплексном лечении больных РЖ позволило добиться проведения большего количества курсов ПХТ. Так, в 1-й группе больных, получавших ФМ-40 на фоне основного лечения, количество курсов полихимиотерапии было проведено практически вдвое больше (в 1,7 раза) по сравнению с контрольной группой, 73 и 44 курса соответственно.

Также была проанализирована выживаемость больных распространенным РЖ с применением ФМ-40 (табл. 7). Как следует из нее, средняя продолжительность жизни в 1-й группе (операция + ПХТ + ФМ-40) составила 14,3 мес, медиана выживаемости — 11 мес, в контрольной группе больных (операция + ПХТ) — 5,4 мес, медиана — 5,8 мес. В 3-й группе (операция + ФМ-40) средняя продолжительность жизни больных составила 15,1 мес, медиана выживаемости — 12 мес, в контрольной группе (операция) — 6,3 мес и 5 мес соответственно.

Таким образом, использование ФМ-40 в комплексной терапии распространенного РЖ способствовало продлению жизни больных.

На рис. 1 представлены кривые выживаемости больных распространенным РЖ при комплексном лечении. Как видно из рисунка, 1- и 3-летняя выживаемость

Таблица 7

Выживаемость больных распространенным РЖ при использовании ФМ-40

Группа	Лечение	Продолжительность жизни, мес M±m	Медиана, мес	Выживаемость, %		
				1 год	2 года	3 года
1	Операция + ПХТ + ФМ-40	14,3±2,3	11	47±12,1	12,1±7	6±0,5
2	Операция + ПХТ	5,4±0,7				
3	Операция + ФМ-40	15,1±2,2	12	50±12,5	26	-
4	Операция	6,3±0,9				

больных на фоне приема ФМ-40 составила 47±12,1 % и 6±0,5 % соответственно. В контрольной группе (группа 2) лишь 11 % больных пережили 1-летний срок, 3-летней выживаемости не отмечено. Подавляющее большинство больных погибли в 1-й год после перенесенного лечения.

Кривые выживаемости больных распространенным РЖ при хирургическом лечении с применением

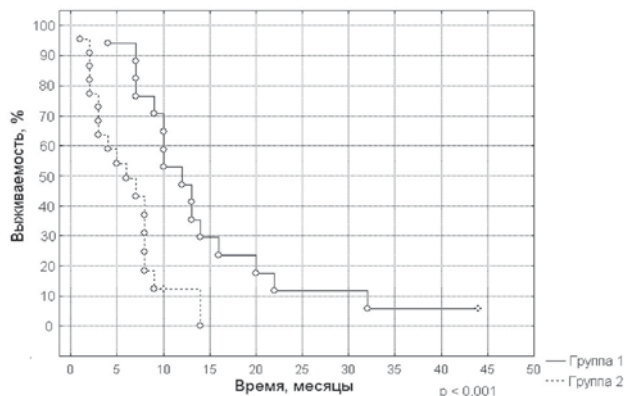


Рис. 1. Выживаемость больных распространенным РЖ при комплексном лечении:

группа 1 — больные, прошедшие хирургическое лечение с последующей ПХТ на фоне приема ФМ-40; группа 2 — больные контрольной группы

и без применения ФМ-40 представлены на рис. 2. Как следует из него, в 3-й группе 1-летняя выживаемость больных составила 50±12,5 %. В контрольной группе один год пережили всего 17,6±8 %.

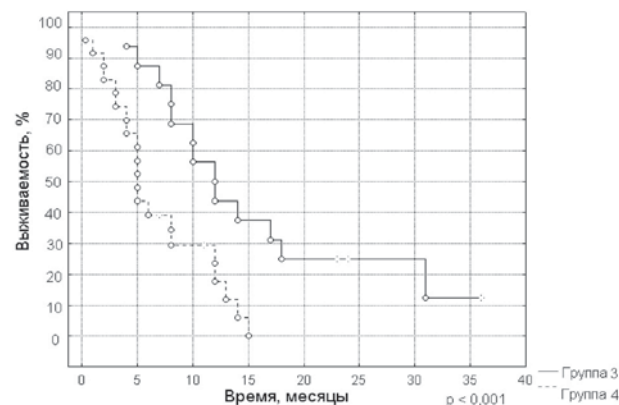


Рис. 2. Выживаемость больных распространенным РЖ при хирургическом лечении:

группа 3 — больные, прошедшие хирургическое лечение на фоне приема ФМ-40; группа 4 — больные контрольной группы

Анализ полученных результатов позволяет сделать заключение, что использование комплексного фитоадаптогена повышает эффективность комплексной терапии больных распространенным РЖ.

Комплексные фармакологические эффекты ФМ-40, возможно, обусловлены структурной и функциональной связью многих веществ, входящих в состав препарата (гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, салидрозид, схизандрин, урсоловая кислота, олеаноловая кислота, глицирризиновая кислота, бетулин и др.), со стероидами, которые благодаря своей структуре имеют множество физиологических активностей. Так, стероидный скелет обеспечивает способность молеку-

лы встраиваться в плазматические мембраны, связываться с ядерными рецепторами, действуя непосредственно на транскрипцию мРНК и соответственно на синтез белка. Наряду с этим показано, что отдельные гинзенозиды, например, способствуют усилению гуморального и клеточно-опосредованного иммунитета (Rg1), прямой цитотоксической и подавляющей рост активности в отношении опухолевых клеток (Rh2, Rb1, Rb2, Rc) индукции дифференцировки (Rh1, Rh2, Rh3) и угнетению метастазов (Rg3), обеспечивают антимуtagenность (Rh2: усиление корректорной активности ДНК-полимеразы), усиление цитотоксичности противоопухолевых средств (Rd1-K), индукцию апоптоза (RcM1) в опухолевых клетках, коррекцию гомо- и гетеротипических адгезионных взаимодействий (Rh1, Rh2, Rg3) и др.

Таким образом, увеличение продолжительности жизни больных распространенным раком желудка и снижение уровня опухолевого маркера СА 19-9 при использовании ФМ-40, вероятно, опосредовано усилением иммунологических (в том числе интерферогенных и адгезиогенных), эндокринных и антиоксидантных механизмов защиты организма от опухоли, а также обусловлено возможным дифференцировочным эффектом ФМ-40 на опухолевые клетки.

ВЫВОДЫ

1. Применение Фитомикса-40 вызывало коррекцию показателей иммунного статуса у большинства больных распространенным раком желудка: увеличение числа Т-клеток (CD3⁺, CD4⁺ лимфоцитов); иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8); числа В-клеток (CD20⁺ лимфоциты); CD25⁺, CD16⁺, CD11b⁺ и CD18⁺ клеток.

2. Высокая интерферогенная активность Фитомикса-40 определена у всех исследуемых больных распространенным раком желудка, таким образом выявлено отсутствие резистентности к препарату ФМ-40 у 100 % пациентов.

3. Фитомикс-40 положительно влиял на систему антиоксидантной защиты у больных распространенным раком желудка, которое выражалось в снижении содержания малонового диальдегида, а также нормализации активности ферментов глутатионтрансферазы, супероксиддисмутазы и каталазы.

4. Под влиянием Фитомикса-40 у больных распространенным раком желудка уровень гормона кортизола в сыворотке крови снижался.

5. При использовании Фитомикса-40 у больных распространенным раком желудка концентрация в сыворотке крови опухолеассоциированного антигена СА 19-9 снижалась, маркера РЭА достоверно не изменялась.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук М. А. Мезенцевой (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН) за предоставленный материал для публикации данной работы.

Работа поддержана ассигнованиями из Федерального бюджета по индивидуальным проектам: "Разра-

ботка растительного адаптогена для лечения предопухолевых патологий" (2002-2003 гг.) и "Определение чувствительности иммунной системы больных раком желудка IV стадии к терапии фитоадаптогеном" (2004 г.) в рамках обеспечения финансирования важнейших народнохозяйственных программ от Министерства образования и науки Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочарова О. А., Карпова Р. В., Голубева В. А. и др. Токсикологическое изучение препарата Фитомикс-40 // Гигиена и санитария. — 1999. — № 6. — С. 60–63.

2. Бочарова О. А., Щеголева Р. А., Лисина Н. И. и др. Изучение радиопротекторного действия фитомикстуры на мышах // Российский биотерапевтический журнал. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 152.

3. Бочарова О. А., Пожарицкая М. М., Чекалина Т. Л. Возможности повышения эффективности комплексного лечения больных лейкоплакией слизистой оболочки полости рта при использовании растительного препарата Фитомикс-40 // Стоматология. — 2003. — № 3. — С. 123–136.

4. Бочарова О. А., Чекалина Т. Л., Пожарицкая М. М., Карпова Р. В. Механизмы патогенеза лейкоплакии и возможности их коррекции комплексным фитоадаптогеном / Коллективная монография «Экспериментальная онкология на рубеже веков» / Под ред. Барышников А. Ю., Давыдова М. И., 2003. — С. 349–381.

5. Бочарова О. А., Матвеев В. Б., Карпова Р. В. и др. Эффективность комплексного фитоадаптогена при лечении доброкачественной гиперплазии предстательной железы // Андрология и генитальная хирургия. — 2004. — № 4.

6. Бочарова О. А., Барышников А. Ю. Фитоадаптогены в онкологии. — М.: ЗооМедВет, 2005. — 139 с.

7. Гарин А. М. Вклад лекарственной терапии в повышение общей выживаемости онкологических больных // IX Российский Онкологический Конгресс. — М. — 24-25 ноября 2005. — <http://www.rosoncology.ru/library/congress/09/index.htm>

8. Гольдберг Е. Д., Зуева Е. П. Препараты из растений в комплексной терапии злокачественных новообразований. — Томск: Изд-во Томского ун-та, 2000. — 129 с.

9. Давыдов М. И., Аксель Е. М. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2002 г. — М., 2004.

10. Давыдов М. И., Тер-Ованесов М. Д., Полоцкий Б. Е., Туркин И. Н. Рак желудка / Энциклопедия клинической онкологии. — М., 2004. — С. 223–238.

11. Знаменский В. В., Щеголева Р. А., Лисина Н. И., Бочарова О. А. Изучение противолучевой активности многокомпонентной фитомикстуры (ФМ-40) в опытах на собаках. // Материалы XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — М., 2004. — С. 789.

12. Переводчикова Н. И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. — М., 2005. — С. 704.

13. Пожарицкая М. М., Бочарова О. А., Чекалина Т. М. и др. Современные аспекты патогенеза и лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта: Методическое пособие для врачей. — Москва, 2004. — С. 44.
14. Тюляндин С. А. Метастатический рак желудка // — ASCO 2003. — <http://www.rosoncoweb.ru/library/asco/39/01/htm>.
15. Яременко К. В., Пашинский В. Г. Злокачественные опухоли: лечение и лекарственная профилактика. — СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2003. — 166 с.
16. Anoja S. A., Ji A. W., Chun-Su Y. Ginseng Pharmacology, multiple constituents and multiple actions // *Biochemical Pharmacology*. — 1999. — Vol. 58 — P. 1685–1693.
17. Bocharova O., Kucheryanu V. G., Kryzhanovsky G. N. et al. Phitomix-40 antiparkinsonian and antioxydant activities // Proc. 2 World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutics Technology. — Paris, 1998. — P. 1116–1117.
18. Bocharova O., Serebriakova R., Philipova T. et al. The first in vitro and in vivo trials of the phytomixture for anti-cancer treatment // *Farmaceutski vestnik*. — 1997. — Vol. 48. — P. 414–415.
19. Davydov M., Krikorian A. Eleutherococcus senticosus as an adaptogen: a closer look // *J. Ethnopharmacol.* — 2000. — Vol. 72, № 3. — P. 345–393.
20. Kelly G. S. *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen // *Altern. Med. Rev.* — 2004. — 24 (9). — P. 633–655.
21. Kim H. S., Lee E. H. et al. Effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells // *Arch. Pharm. Res.* — 2004. — Vol. 27, № 4. — P. 429–435.
22. Kucinskaite A., Briedis V., Savickas A. Experimental analysis of therapeutic properties of *Rhodiola rosea* L and its possible application in medicine // *Medicina*. — 2004. — 40 (7). — P. 614–619.
23. Roth A. D., Ajani J. Docetaxel-based chemotherapy in the treatment of gastric cancer // *Ann. Oncol.* — 2003. — 14 Suppl. — 2. — P.1141–1144.
24. Xu A. H., Chen H. S., Sun B. C. et al. Therapeutic mechanism of ginkgo biloba exocarp polysaccharides on gastric cancer // *World. J. Gastroenterol.* — 2003. — 9 (11). — P. 2424–2427.
25. Zeng X. L., Tu Z. G. Induction of differentiation by ginsenoside Rh2 in hepatocarcinoma cell SMN1C-7721 // *Ai. Zheng.* — 2004. — 23 (8). — P. 879–884.

Поступила 11.04.2006.

УДК 615.277.3.038:616-097

L. V. Manzyuk¹, E. V. Artamonova¹, T. A. Karmakova², R. I. Yakubovskaya¹

RESULTS OF PHASE 1-2 CLINICAL STUDIES OF IMUTERAN

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

²*Herzen Research Oncological Institute, Moscow*

ABSTRACT

Imuteran, the original russian drug, was prepared based on monoclonal ICO-25 antibody raised against epithelial mucin MUC-1 (CD229) by N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center jointly with Herzen Research Oncological Institute. Pre-clinical investigations demonstrated the high specificity and high anticancer activity of drug *in vivo* and *in vitro*. There was also mentioned the low toxicities of ICO-25. Phase I clinical study included 10 patients. Imuteran was given at a single dose from 5 mg - 100 % to 46,25 mg - 925 %. The basic side reaction was hypersensitivity reaction. 35 mg Imuteran (700 %), intravenous once per week, 4 treatments with premedication of dexametazon and dimedrol were used in phase II clinical study. At present 20 patients were entered in phase II clinical study. The 20 patients received a total of 26 treatment cycles. Response to treatment was evaluated in 16 patients. The disease regression was not observed. Median survival about 10 weeks (11,8+4,3 weeks) was detected in 6 (37,5 %) patients (breast cancer - 2, colorectal cancer - 2, saplings cancer - 2), disease progression was found in 10 (62,5 %) patients. The treatment was interrupted in 3 (15 %) patients because of high toxicity (allergic reaction - 2, colon paresis - 1). The study is continued.

Key words: imuteran, monoclonal antibody, phase I and II clinical study.

Л. В. Манзюк¹, Е. В. Артамонова¹, Т. А. Кармакова², Р. И. Якубовская²

РЕЗУЛЬТАТЫ I-II ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПРЕПАРАТА ИМУТЕРАН

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

²*МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва*

РЕЗЮМЕ

Имутеран — оригинальный отечественный препарат, созданный совместно РОНЦ им. Н. Н. Блохина и МНИОИ им. П. А. Герцена на основе субстанции мышинных моноклональных антител ICO-25, полученных к эпитопу эпителиального муцина MUC-1 (CD229). Доклинические исследования продемонстрировали высокую специфичность, значительную противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* и низкую токсичность ICO-25. Клинические испытания Имутерана по I фазе проведены 10 больным распространенным опухолевым процессом. Проводилась эскалация разовых доз по модифицированной шкале Фибоначчи от стартовой (5 мг — 100 %) до максимальной (46,25 мг — 925 %). Основными побочными эффектами были реакции гиперчувствительности. Для II фазы клинических испытаний был рекомендован режим введения Имутерана по 35 мг (700 % стартовой дозы) в/в капельно 1 раз в нед — 4 введения с премедикацией дексаметазоном и димедролом. На настоящий момент в исследование по II фазе включены 20 больных, которым проведено 26 курсов лечения. Эффект оценен у 16 пациентов. Объективных регрессий не наблюдалось. Стабилизация длительностью 11,8+4,3 нед (медиана 10 нед) зарегистрирована в 37,5 % (6 из 16) случаев (рак молочной железы — 2, рак толстой кишки — 2, рак маточной трубы — 2), прогрессирование — в 62,5 % (10 из 16) случаев. Из-за токсичности (аллергические реакции — 2, парез кишечника — 1) лечение было прекращено у 15 % (3 из 20) больных. Исследование продолжается.

Ключевые слова: Имутеран, моноклональные антитела, I и II фаза, клинические испытания.

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы достигнут существенный прогресс в использовании препаратов, созданных на основе моноклональных антител (МКА), для лечения рака. Одним из таких лекарственных агентов является Имутеран — оригинальный отечественный препарат, созданный совместно в РОНЦ РАМН им. Н. Н. Блохина и МНИОИ им. П. А. Герцена.

Основное действующее вещество препарата Имутеран — мышинное моноклональное антитело ICO-25 — иммуноглобулин класса IgG1, полученное к эпителио муциноподобного антигена MUC-1 (CD 229) [4]. Проведенные иммуногистохимические исследования показали, что MUC-1 с высокой частотой экспрессируется клетками злокачественных опухолей эпителиального происхождения. Так, МКА ICO-25 реагировали с клетками рака молочной железы в подавляющем большинстве случаев — 93,2%. Антиген локализовался как на мембране, так и в цитоплазме злокачественных клеток, а его экспрессия не зависела от гистологического типа опухоли [2]. Экспрессия антигена клетками нормальной молочной железы была незначительной (антиген локализовался только на апикальной части клеточной мембраны эпителия протоков). Такой же высокой частотой экспрессии MUC-1 характеризуются рак желудка, рак толстой кишки, рак яичников.

Моноклональные антитела ICO-25 реагировали не только с первичной опухолью, но и с метастатическими опухолевыми клетками в регионарных лимфоузлах и костном мозге больных [3]. Так, частота выявления метастазов в регионарные лимфоузлы превышала результаты стандартного патоморфологического исследования для рака молочной железы на 10,8 %, для рака желудка — на 27,2 %, причем наличие морфологически не определяемых микрометастазов при раке желудка коррелировало с прогрессированием заболевания при дальнейшем наблюдении [6]. Исследование костного мозга с помощью моноклональных антител ICO-25 позволяло выявить даже 1 раковую клетку на 1000000 гемопоэтических, а обнаружение опухолевых клеток в стерильном пунктате больных раком молочной железы коррелировало с увеличением частоты выявления метастазов в кости при дальнейшем наблюдении [1].

В эксперименте на модели гетеротрансплантата рака толстой кишки человека (штамм РТК-1) было показано, что внутривенное введение МКА ICO-25 приводит к торможению роста опухоли [7]. Токсикологические исследования показали, что Имутеран по классификации степени опасности острого и хронического токсического действия малоопасное вещество [5].

Высокая специфичность МКА ICO-25, низкий уровень экспрессии MUC-1 в нормальных тканях и высокое содержание антигена в раковых клетках, а также продемонстрированный на модели *in vivo* противоопухолевый эффект способствовали созданию и передаче в клинику Имутерана.

Лекарственная форма: стерильный раствор мышинных моноклональных антител ICO-25 в концентрации 5 мг/мл; во флаконе — 5 мл, 25 мг МКА ICO-25.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В соответствии с решением Фармакологического комитета МЗ РФ в НИИ КО РОНЦ РАМН им. Н.Н.Блохина была проведена I фаза клинических испытаний препарата Имутеран в качестве противоопухолевого средства.

В исследование включены 10 больных различными злокачественными опухолями. Все больные имели диссеминированный, морфологически подтвержденный опухолевый процесс, возможности других методов специфического лечения были полностью исчерпаны. Распределение больных в зависимости от нозологии представлено в табл. 1.

Задачами I фазы клинических испытаний является определение разовой и максимально переносимой дозы препарата, режима введения и дозолимитирующей токсичности. Оценка побочных эффектов проводилась по критериям ВОЗ.

Таблица 1

Распределение больных, получавших Имутеран, в зависимости от нозологии (I-II фаза клинических испытаний)

I фаза	Число больных
Рак молочной железы	6
Метастазы из невыявленного первичного очага	2
Рак яичников	1
Рак тела матки	1
Всего	10
II фаза	
Рак молочной железы	6
Рак толстой кишки	5
Рак яичников	6
Рак маточной трубы	2
Зл. гетериног. опухоль яичников	1
Всего	20

В ходе I фазы проводилась эскалация разовых доз Имутерана по модифицированной шкале Фибоначчи. Стартовая разовая доза составила 5 мг. Имутеран растворяли в 250 мл изотонического раствора NaCl и вводили внутривенно капельно со скоростью 5 мл/мин в 1-й, 8-й, 15-й и 22-й дни курса (1 раз в нед — 4 введения).

Схема эскалации разовых и суммарных доз Имутерана представлена в табл. 2.

В рамках проводимой программы лечение Имутераном по II фазе получили 20 больных диссеминированными злокачественными опухолями (см. табл. 1), у которых возможности других методов специфического лечения были полностью исчерпаны (в том числе проведено по 3 — 5 линий химиотерапии).

Метастазы в печень были выявлены в 45 % случаев (9 из 20), в лимфоузлы — в 35 % (7 из 20), в кости —

Таблица 2

Эскалация доз Имутерана по модифицированной шкале Фибоначчи (I фаза)

% от дозы	Разовая доза Имутерана, мг	Количество введений	Курсовая доза Имутерана	Количество больных
100	5	4	20	1
350	17,50	4	70	2
525	26,25	4	105	1
700	35,00	4	140	3
925	46,25	4	185	1
		1	46,25	2

в 20 % (4 из 20), в легкие — в 20 % (4 из 20, в 1 случае в сочетании с плевритом), диссеминация по брюшине — в 30 % (6 из 20), метастазы в мягкие ткани — в 10 % (2 из 20), рецидив в малом тазу — в 20 % случаев (4 из 20). Большинство больных (13 из 20) имели сочетанное поражение органов и систем (от 2 до 4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении I фазы клинических испытаний 10 больных получили 10 курсов терапии Имутераном (всего 34 введения). 8 пациентам запланированное лечение проведено полностью, 2 — после 1-го введения Имутерана в дозе 925 % от первоначальной (46,25 мг) из-за развившихся осложнений лечение было прекращено.

Наблюдались следующие побочные реакции:

- озноб — во время инфузии, сразу по окончании инфузии или через несколько часов — у 60 % (6/10) больных при 32,4 % введений (11/34); у 3 пациенток озноб отмечен во время 1-го введения препарата в дозах 17,5 мг (1 больная) и 46,25 мг (2 больные); еще у 3 — при повторных введениях в дозе 26,25 мг (1 больная), 35 мг (1 больная) и 46,25 мг (1 больная);
- тошнота и однократная рвота — у 20 % (2/10) больных при 5,9 % введений (2/34);
- аллергические реакции (крапивница, отек Квинке) — у одной больной (10 %) при 1-м введении имутерана в дозе 46,25 мг — лечение прекращено;
- сильные боли в костях — у 1 больной (10 %) с метастазами в кости при 1-м введении имутерана в дозе 46,25 мг в сочетании с ознобом, подъемом АД — лечение прекращено;
- падение АД, ортостатический коллапс — у 2 больных (20 %) при 11,8 % введений (4/34);
- повышение АД — у 2 больных (20 %) при 8,8 % введений (3/34).

Таким образом, 2 из 10 пациенток (20 %) после 1-го введения Имутерана в дозе 46,25 мг (925 % от первоначальной) из-за побочных реакций лечение было прекращено.

Существенного влияния Имутерана на основные показатели периферической крови (гемоглобин, лейкоциты, тромбоциты), свертывающей системы (протромбиновое время, фибриноген, РКМФ этаноловый тест, толерантность плазмы к гепарину) и биохимию крови (глюкоза, креатинин, билирубин, общий белок, трансаминазы, щелочная фосфатаза) не отмечено.

При проведении I фазы программа эскалации доз была выполнена полностью. При введении Имутерана в дозе 46,25 мг (925 % от первоначальной) у 2 из 3 пациенток отмечены реакции, потребовавшие прекращения лечения.

Основными побочными эффектами Имутерана были реакции гиперчувствительности (озноб, коллапс, крапивница, отек Квинке).

Для II фазы клинических испытаний был рекомендован следующий режим лечения: Имутеран по 35 мг (700 % от стартовой дозы) внутривенно капельно 1 раз в нед 4 введения. Для профилактики реакций гиперчувствительности была рекомендована премедикация: дексаметазон 20 мг в/м, димедрол 1%-ный — 1,0 в/м за 30 мин до введения.

На 1-м этапе II фазы 7 пациентов получали лечение в следующем режиме: по 35 мг в/в капельно 1 раз в нед — 4 введения с последующим 3-нед перерывом.

В дальнейшем лечение осуществлялось еженедельно, без перерыва, до запланированного контрольного обследования.

Всего проведено 26 курсов лечения (23 полных и 3 неполных): 16 пациентов получили по 1 курсу, 3 — по 2 курса и еще 1 — 4 курса лечения Имутераном.

У 85 % больных (17 из 20) при проведении 23 курсов из 26 (88,5 %) осложнений не отмечено.

У 2 пациенток при проведении 1-го курса лечения на 2-м и 3-м введениях препарата соответственно развилась аллергическая реакция в виде бронхоспазма в сочетании с аллергическим дерматитом и бронхоспазма в сочетании с отеком Квинке. У одной пациентки в процессе проведения 1-го курса развился парез кишечника, имитирующий кишечную непроходимость, и произведено хирургическое вмешательство по месту жительства. Всего у 15 % больных (3 из 20) зарегистрирована неприемлемая токсичность, потребовавшая прекращения лечения, из анализа эффективности больные исключены.

Еще у 1 пациентки после повторного пересмотра гистологических препаратов установлен диагноз злокачественной герминогенной опухоли яичников, из анализа эффективности больная исключена, так как опухоли неэпителиальной природы не содержат антигена MUC-1.

Эффективность Имутерана оценена у 16 больных из 19, результаты представлены в табл. 3.

У 10 из 16 оцененных больных отмечено прогрессирование болезни (62,5 %).

Объективных регрессий опухоли не наблюдалось.

У 6 из 16 больных (37,5 %) отмечалась стабилизация процесса при следующих заболеваниях: РМЖ — у 2 больных длительностью 15 нед и 9 нед; рак толстой кишки — у 2 больных длительностью по 9 нед; рак маточной трубы — у 2 больных длительностью 19 нед и 11 нед.

Средняя длительность стабилизации при лечении Имутераном составила $11,8 \pm 4,3$ нед, медиана — 10 нед. Следует отметить, что все 6 больных со стабилизацией лечение Имутераном начинали на фоне прогрессирования болезни.

Таблица 3

Эффективность Имутерана (II фаза клинических испытаний)

Диагноз	Число больных (оценено)	Число курсов (полных)	Эффект (оценены 16 больных)
Рак молочной железы	6 (4)	7 (5)	2/4 — стабилизация 15 и 9 нед 2/4 — прогрессирование 2 — не оценены (аллергическая реакция, лечение прекращено)
Рак толстой кишки	5 (5)	6 (6)	2/5 — стабилизация 9 и 9 нед 3/5 — прогрессирование
Рак яичников	6 (5)	6 (5)	5/5 — прогрессирование 1 — не оценена (парез кишечника — лечение прекращено)
Рак маточной трубы	2 (2)	6 (6)	2/2 — стабилизация 19 и 11 нед
Всего	19 (16)	25 (22)	6/16 (37,5%) — стабилизация 11,8+4,3 нед (медиана 10 нед) 10/16 (62,5%) — прогрессирование

Влияния препарата на показатели периферической крови, биохимию и свертывающую систему во время проведения II фазы клинических испытаний также не отмечено.

Специальные лабораторные исследования при II фазе клинических испытаний препарата Имутеран проводились в МНИОИ им. П. А. Герцена.

Как потенциальные критерии отбора пациентов для лечения оценивались следующие показатели:

1) относительное содержание субпопуляции лимфоцитов, характеризующее состояние эффективного звена иммунитета, непосредственно участвующего в реализации действия пассивной иммунотерапии;

2) содержание Муцина MUC-1 в крови больных, так как свободно циркулирующий антиген может связывать вводимые МКА и таким образом влиять на эффективность лечения.

Состояние лимфоцитарного звена иммунитета определяли по результатам фенотипирования мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных из гепаринизированной венозной крови методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к CD3⁺ (общая субпопуляция лимфоцитов), CD4⁺ (Т-хелперы/индукторы), CD8⁺ (Т-киллеры/супрессоры), CD16⁺ (естественные киллеры), CD20⁺ (В-лимфоциты), CD25⁺ (лимфоциты, экспрессирующие рецептор и ИЛ-2) и антигену гистосовместимости HLA-DR.

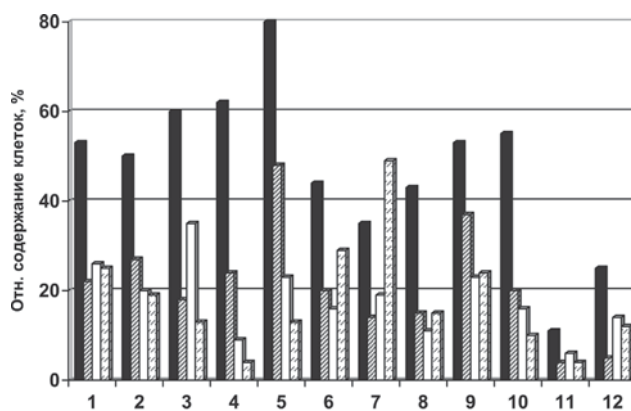
Обследованы 12 пациентов с различными злокачественными опухолями. Забор крови осуществлялся до начала лечения и перед каждым введением Имутерана. Особое внимание уделяли анализу состояния больных, у которых отмечались аллергические реакции на введение препарата.

До начала лечения у подавляющего большинства больных наблюдались нарушения различной степени выраженности. Динамика изменений показателей у отдельных больных была индивидуальной и часто разнонаправленной. Тем не менее анализ результатов позволил выявить некоторые закономерности:

1) у большинства больных (9 из 12) снижено относительное количество одной или нескольких Т-клеточных субпопуляций CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺. Длительность стабилизации процесса была менее продолжительной у больных с более выраженными нарушениями. У 2 больных с наиболее выраженной недостаточностью по Т-лимфоцитарному звену была получена аллергическая реакция при 1-м же введении препарата, чего не наблюдали у больных с более сохранной Т-клеточной популяцией.

2) у 5 из 12 больных до лечения было значительно повышено процентное содержание CD16⁺ клеток; у остальных — снижено незначительно или в пределах физиологической нормы. При этом у большинства больных, леченных без эффекта, в процессе динамического наблюдения количество CD16⁺ клеток существенно увеличивалось, в 1,5-3 раза превышая верхнюю границу физиологической нормы. У пациентов со стабилизацией процесса наблюдали либо умеренное повышение CD16⁺ клеток (как правило, после первого же введения Имутерана) с последующей нормализацией показателя, либо сохранение этого показателя в пределах нормы на протяжении всего курса лечения.

На рисунке представлены данные, характеризующие исходное состояние эффекторного звена иммунитета 12 больных.



Исходное состояние эффекторного звена иммунитета у 12 больных: ■ CD3+ ▨ CD4+ □ CD8+ ▩ CD16+

У 2 больных (11 и 12) после 1-го введения Имутерана отмечались выраженные аллергические реакции в виде падения артериального давления (АД), легкой формы отека Квинке, аллергической сыпи на коже. Таким образом, можно предположить, что сбалансированное состояние Т-клеточного звена иммунитета — благоприятный фон для реализации эффекта иммунотерапии, а острый дефицит, в частности, по Т-клеточной популяции, является фактором риска развития побочных реакций аллергического характера на фоне и сразу после введения препарата.

По-видимому, больным с выраженными нарушениями иммунного статуса целесообразно проведение иммунокоррекции перед назначением Имутерана.

Уровень содержания муцина MUC1 в крови пациентов определялся методом иммуноферментного анализа.

Стабилизация заболевания наблюдалась у больных с относительно низким количеством антигена в крови (сравнимым с его количеством у условно здоровых лиц или превышающим верхнюю границу этих значений не более, чем в 1,5 раза). Отсутствие эффекта иммунотерапии наблюдалось преимущественно у больных с относительно высоким содержанием антигена в кровотоке.

У 1 больной содержание MUC-1 в крови было настолько низким, что чувствительности метода не хватало для его количественной оценки. У данной пациентки было отмечено развитие аллергической реакции при 3-м введении Имутерана, и лечение было прекращено. Возможно, что отсутствие в кровотоке антигена, связывающего мышинные антитела, является фактором, увеличивающим интенсивность клеточного и гуморального ответа, и увеличивает риск возникновения нежелательных побочных эффектов.

В табл. 4 представлены данные о 12 больных, получавших Имутеран в РОНЦ РАМН и МНИОИ им. П. А. Герцена, отражающие уровень MUC-1 и результаты лечения.

Таблица 4

Взаимосвязь между уровнем антигена MUC-1 в крови и результатами лечения

Концентрация MUC-1, усл. ед.	Клиническая оценка состояния
98	Стабилизация 32 нед.
52	Стабилизация 32 нед.
166	Стабилизация 24 нед.
141	Стабилизация 19 нед.
36	Стабилизация 11 нед.
117	Прогрессирование
209	Прогрессирование
2312	Прогрессирование
19000	Прогрессирование
461	Прогрессирование
406	Прогрессирование
0	Анафилактическая реакция на 3 введении

Кроме MUC-1, у пациентов определяли показатель НАМА (human antiouse anti bodies), отражающий специфический ответ организма пациентов на введение мышинных антител (Имутеран).

Предварительные результаты проведенных исследований позволяют предположить, что высокий исходный уровень MUC-1 в крови (более 200 усл. ед.) и отсутствие детектируемого НАМА — ответа на фоне первых введений — являются факторами неблагоприятного прогноза в отношении эффективности лечения Имутераном.

ВЫВОДЫ

Оценивая результаты II фазы клинических испытаний Имутерана на ограниченном числе больных, необходимо отметить:

1) препарат может сдерживать прогрессирование болезни, давая стабилизации у трети больных с диссеминированными злокачественными эпителиальными опухолями, такими, как рак маточной трубы, рак молочной железы и толстой кишки;

2) у части больных (10-15 %), несмотря на проведение премедикации, возникают тяжелые побочные реакции гиперчувствительности, вероятно, обусловленные тем, что Имутеран является препаратом нативных мышинных моноклональных антител, к которым быстро образуются нейтрализующие антитела. Возникновение таких реакций затрудняет клинические испытания;

3) выраженные нарушения исходного иммунного статуса и высокий уровень MUC-1 в крови пациентов, по-видимому, обуславливают отсутствие эффекта при лечении Имутераном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артамонова Е. В., Паниченко А. В., Рязанцева С. Н. и др. Моноклональные антитела в диагностике метастазов рака молочной железы // IX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». — Москва, 8 — 12 апреля 2002 г. — С. 29.

2. Артамонова Е. В., Тупицын Н. Н., Кадагидзе З. Г. и др. Роль эпителиальных антигенов в диагностике и стадировании рака молочной железы // Архив патологии. — 2002. — Т. 64, № 6. — С. 13–15.

3. Артамонова Е. В., Овсянников С. В., Тупицын Н. Н. и др. Иммунологическая диагностика метастазов рака молочной железы и рака желудка в лимфатические узлы // Врач. — 2003. — № 1. — С. 34–36.

4. Барышников А. Ю. Моноклональные антитела в биотерапии рака // Мат. I всерос. научно-практ. конф. «Биотерапия рака». — Москва, 18-20 июня 2002 г. — С. 15–17.

5. Кармакова Т. А., Немцова Е. Р., Безбородова О. А. и др. Имутеран — новый препарат для иммунотерапии рака // Мат. I всерос. научно-практ. конф. «Биотерапия рака». — Москва, 18-20 июня 2002 г. — С. 33–35.

6. Овсянников С. В., Давыдов М. И., Тупицын Н. Н. и др. Иммуноморфологическое обоснование расширенных лимфодиссекций при раке желудка // Онкология и радиология Казахстана. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 42–48.

7. Karmakova T., Bezborodova O., Nemtsova E., Yakubovskaya R. Antitumor efficiency of monoclonal antibody in therapy of nude mice with xenograft of human colon carcinoma // Proceed. 10th NCI-EORTC Symp. On New Drugs in cancer therapy. — Amsterdam, 1998. — P. 88.

Поступила 17.03.2006.

УДК 616.24+616.33]-006.6-085.277.3:061.6

*A. M. Garin, A. Yu. Baryshnikov, Z. G. Kadagidze, I. S. Bazin***THE EXPERIENCE OF KANGLAITE INJECTION GAINED IN
N. N. BLOKHIN RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER RAMS***N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow***ABSTRACT**

Kanglaite (KLT), an oil ultraemulsion, has been prepared in China by extraction of anticancer components from Coix seed.

The clinical investigations in China demonstrated that KLT increases the effect of combined chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer and gastric cancer about 15-20 %. It was also noted that such treatment strategy gives a 5-years and more survival in few cases. There were 17 patients with lung cancer in the combination group at the Russian Cancer Research Center. The results of therapy with KLT in combination with Etoposid (E) and Cisplatin (P) or Gemcitabin (G) indicated that the median survival was to 16,1 months in compare to monotherapy with EP - 9,7 months or GP - 9 months. The combined therapy with KLT and ELF (Etoposid + Leikovorin + 5-flourouracil) of 18 patients with gastric cancer increased the survival time of these patients up to 9 months in compare to 7 months survival without KLT.

Key words: non-small cell lung cancer, gastric cancer, chemotherapy, Kanglaite.

*A. M. Гарин, А. Ю. Барышников, З. Г. Кадагидзе, И. С. Базин***ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ КАНГЛАЙТА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ В
РОССИЙСКОМ ОНКОЛОГИЧЕСКОМ НАУЧНОМ ЦЕНТРЕ
ИМ. Н. Н. БЛОХИНА РАМН***ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва***РЕЗЮМЕ**

Канглайт приготовлен в Китае путем экстракции эффективных противоопухолевых компонентов из семян Коикса, лекарственная форма — жировая ультраэмульсия.

В клинических исследованиях в Китае установлено, что Канглайт повышает эффект химиотерапевтических комбинаций у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) и раком желудка (РЖ) на 15-20 %, отмечены случаи долгожительства некоторых пациентов с указанными опухолями. В Российском онкологическом научном центре проведено комбинированное лечение Канглайтом для инъекций (КЛТ) и режимами с включением этопозид и цисплатина или гемцитабина и цисплатина у 17 больных раком легкого. Медиана выживаемости этих пациентов составила 16,1 мес (стандартная медиана выживаемости при лечении по схеме EP — 9,7 мес, по схеме GP — 9 мес). При лечении 18 больных раком желудка КЛТ и режимом ELF (этопозид + лейковорин + фторурацил) медиана выживаемости составила 9,3 мес. По литературным и собственным данным, режим ELF (без КЛТ) приводит к медиане выживаемости в 7 мес.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, химиотерапия, Канглайт.

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях методы молекулярной терапии, которые стали возможными после идентификации мишеней, ответственных за раковую трансформацию, серьезно теснят химиотерапевтические принципы лечения раковых больных. Препараты, связывающие эти мишени, прерывающие или восстанавливающие

последствие мутаций онкогенов и супрессорных генов, получили название таргетных.

Российские исследователи А. Ю. Барышников и другие заинтересовались информацией о таргетных свойствах китайского препарата КЛТ. Их внимание привлекли сообщения китайских авторов о способности КЛТ индуцировать апоптоз в опухолевых клетках,

ингибировать образование новых сосудов в опухолях, регулировать экспрессию некоторых опухолеассоциированных антигенов, снижать метастатическую активность опухолей, блокировать множественную лекарственную устойчивость, задерживать клеточный цикл в фазе G₂, проявлять иммуномодулирующее действие [5; 6; 8; 9].

Злак Коикс, произрастающий в Китае, тысячу лет использовался в традиционной китайской медицине для лечения различных хронических болезней и опухолей в том числе. Профессором Ли Дапенг осуществлена экстракция эффективных противоопухолевых компонентов из семян Коикса. В китайских лабораториях и клиниках создан и широко изучен препарат КЛТ для инъекций (ультражировая эмульсия).

После констатации эффекта КЛТ в режиме монотерапии рака легкого (12,5 %) препарат изучен в комбинациях с различными химиотерапевтическими режимами. Оказалось, что сочетание с КЛТ приводит к синергическому эффекту. Например, режим винорельбин + ифосфамид эффективен у 36,6 %, а при сочетании с КЛТ — у 53,1 % больных. Режим MVP активен у больных НМРЛ в 22 %, при сочетании с КЛТ — в 45 % случаев [4; 7].

Аналогичные данные были получены при исследовании комбинаций химиопрепаратов с КЛТ при первичном раке печени, раке желудка, пищевода и других опухолях [6].

Отмечена низкая токсичность препарата и яркий симптоматический эффект. Обращали на себя внимание случаи долгожительства отдельных больных диссеминированным раком разных органов, в комплексную терапию которых был включен КЛТ.

КЛТ находится в арсенале противоопухолевых средств Китая с 1997 г. За этот период препарат получили сотни тысяч больных.

ИССЛЕДОВАНИЕ 1

В начале 2002 г. ФК МЗ России было разрешено клиническое изучение КЛТ при НМРЛ с последовательным применением химиотерапии [1; 2]. Дизайн исследования представлен на рис. 1.

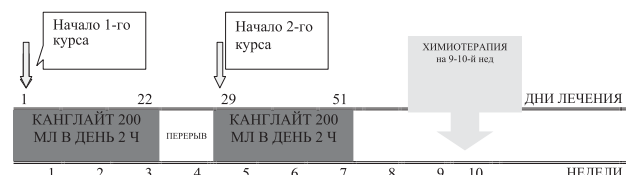


Рис. 1. Дизайн исследования применения КЛТ при НМРЛ с последовательным применением химиотерапии

КЛТ вводился по 200 мл в день, 2 ч в течение 6 нед с перерывом с 22-го по 29-й дни.

В качестве последовательно назначаемой химиотерапии были избраны 2 режима:

- 1) EP — этопозид 100 мг/м² внутривенно (в/в) 1—3-й дни, цисплатин 75 мг/м² в/в д. 1, каждые 3 нед;
- 2) GP — гемцитабин 1000-1200 мг/м² в 1-й и 8-й дни, цисплатин 80 мг/м² д. 1, каждые 3 нед.

Химиотерапия по данным схемам проводилась до прогрессирования заболевания. Испытания выполнялись в Российском онкологическом научном центре и Российском научном центре рентгенорадиологии (РНЦРР), ответственные исследователи Э. К. Возный и Н. Добровольская.

После окончания испытаний в 2003 г. представлен отчет в ФК МЗ России. Сводные данные отражены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты применения КЛТ + химиотерапия при НМРЛ

Число больных	Оценено	Объективный эффект*	Стабилизация*	Прогрессирование*
25	22	4 (18,2)	13 (59)	5 (22,7)
Получили только КЛТ 11	8	1 (12,5)	5 (62,5)	2 (25)
Получили КЛТ + химиотерапию 14	14	3 (21,4)	8 (57,2)	3 (21,4)

* В скобках — %.

Из отчета следует, что эффект у всей группы зарегистрирован в 18,2 %, стабилизация — в 59,1 %, прогрессирование — в 22,7 % случаев. Клиническое улучшение наблюдалось у 17 (77,2 %) из 22 пациентов и сопровождалось симптоматическим эффектом (ослабление одышки, уменьшение кашля и общей слабости). Средняя выживаемость в тот период в группе с клиническим улучшением составила 284,6 дня. 11 больных прожили 300 дней (9 из них были во время отчета живы). Средняя выживаемость больных, леченных КЛТ ± химиотерапия, без эффекта составила 176,4 дня.

Переносимость препарата в дозах 200-300 мл внутривенная инфузия 2-4 ч была вполне удовлетворительная. Побочные эффекты КЛТ характеризовались I степенью снижения гемоглобина у 13 %, переходящим повышением трансаминаз у 13 %, гипертермией у 30 %, аллергической сыпью у 4,3 % больных.

Подтверждено иммуномодулирующее действие КЛТ. На основании результатов отечественных исследований и материалов клинического использования КЛТ на тысячах больных в Китае МЗ России зарегистрировал в 2003 г. КЛТ для лечения диссеминированного НМРЛ в комбинации с химиотерапией.

Поскольку настоящая статья посвящена изложению опыта ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН и нам не известны иные данные о прослеженности больных в РНЦРР, подробно остановимся на собственном материале.

В протокол последовательного назначения КЛТ по 200 мл в/в в течение 8 нед, а затем с 9–10-й нед проведение химиотерапии по схеме EP были включены 13 пациентов. Характеристика больных представлена в табл. 2.

Таблица 2
Характеристика больных НМРЛ, исследование 1

Число больных	13
Средний возраст	57,4
Плоскоклеточный рак	7
Аденокарцинома	4
Недифференцированный рак	2
Стадия IV	7 (53,8 %)
Стадия III б	6 (46,2 %)
Первичная опухоль	13
Метастазы в лимфатические узлы	13
Метастазы в печень	2 (15,3 %)
Метастазы в легкие	3 (23 %)
Метастазы в кости	2 (15,3 %)

Всем пациентам ранее не назначалась химиотерапия. 4 больных получали только КЛТ, 2 — не оценены в связи с ранним прогрессированием заболевания (прожили 26 и 49 дней), у 2 других больных отмечена стабилизация процесса, они прожили 167 и 132 дня, время до прогрессирования заболевания 3,5-4,0 мес, 9 пациентам выполнена программа исследования. Они получили и КЛТ, и химиотерапию. У 4 больных наблюдалась частичная ремиссия, у 2 — стабилизация и у 3 — прогрессирование процесса. Результаты обобщены в табл. 3.

Таблица 3
Результаты последовательного применения КЛТ и химиотерапии (этопозид + цисплатин) при лечении НМРЛ

Всего больных	13
Оценено	11
Частичный эффект	4 (36,3 %)
Эффект < 50 % и стабилизация	4 (36,3 %)
Прогрессирование	3 (27,2 %)
Выжили от 2 до 3 лет	3 (27,2 %)
Выжили от 1 до 1,5 лет	2 (18,2 %)
Всего выжили > 1 года	5 (45,4 %)

Следовательно, выживаемость более года 5 (45,4 %) из 11 больных, 3 (27,2 %) из них выжили от 2 до 3 лет. Медиана выживаемости всей группы больных составила 11,2 мес. Медиана выживаемости 9 пациентов, получавших КЛТ + химиотерапию, составила 383 дня (12,7 мес).

Нами изучался иммунологический статус всех 11 больных, леченных с эффектом [3]. Мы разделили пациентов на 2 группы:

1) прожившие более года после начала терапии КЛТ (n=5);

2) умершие в ранние сроки (n=6).

В табл. 4 представлены средние показатели разных параметров. Из таблицы можно увидеть, что стимулированы в обеих группах CD3⁺, CD8⁺, CD5⁺, CD38⁺, CD7⁺. В таблице выделены жирным шрифтом параметры, которые значительно отличаются в двух группах, в большей степени они стимулированы среди долгоживущих пациентов.

Процент Т-хелперов/индукторов CD4⁺ был ниже нормы у 4 из 5 больных, выживших более года. После применения Канглайта показатель достиг нормы у всех пациентов этой подгруппы, его значение составляло до лечения 32,6 %, после — 48,7 %. Во 2-й подгруппе средний показатель практически не изменился (34,1 % до лечения и 34,0 % после).

Иммунорегуляторный индекс CD4⁺/CD8⁺ увеличился в подгруппе долгоживущих в большей степени после применения КЛТ (до лечения 1,69, после — 1,91); в подгруппе сравнения — 1,22 и 1,28.

Активационный антиген HLA-DR (В-лимфоциты, активированные Т-лимфоциты) снижен у 6 из 11 пациентов, после применения КЛТ он достиг нормы у всех пациентов обеих подгрупп, но его средний показатель был выше у долгоживущих (14,5 %), чем у рано умерших (11,4 %).

Молекула адгезии, семейство кадгерина — CD50⁺ (норма 85-100 %), очень важный показатель прогноза. Уменьшение Т-кадгерина приводит к опухолевой дедифференцировке, увеличению метастазов в лимфоузлах, худшей выживаемости больных раком легкого (Sulzer, 1998).

Этот показатель у 2 из 5 больных, проживших более 1 года, ниже нормы, он был стимулирован в результате терапии у всех 5 больных. Средние показатели до и после лечения — 89,6 % и 95,5 %. В группе рано умерших стимуляция была менее выражена.

Средние показатели NK клеток — CD16⁺ изменились в группе выживших более 1 года и умерших до этого периода следующим образом: 17,9 % — 27,8 % и 19 % — 17,7 % соответственно

Активированный антиген CD25⁺ (альфа-цепь рецептора интерлейкина 2) был стимулирован лишь в 1-й подгруппе с 1,5 % до 4,1 %, во 2-й подгруппе он оставался стабильным.

Суммарный показатель, экспрессированный на В-лимфоцитах, Т-лимфоцитах и NK-клетках, антиген CD45RA⁺ был стимулирован в подгруппе выживших более года с 55,2 % до 58 % и даже несколько снизился в другой подгруппе (с 47 % до 44,6 %).

CD20⁺ антиген (В-лимфоциты, норма 5-15 %) стимулирован в 1-й подгруппе с 7,9 % до 17,9 %, среди рано умерших — 5,8 % и 6,1 %.

Из иммунологических исследований, проведенных в Китае, известно, что КЛТ индуцирует апоптоз опухолевых клеток, уменьшая экспрессию гена *Bcl2*, сдерживающего процесс их физиологической смерти. Стимуляция CD95 (FAS-APO-1 антиген, опосредующий апоптоз, норма 23-60 %) отмечена у 8 из 11 больных и более выражена в группе долгоживущих — до лечения 39,2 %, после лечения — 53,9 % (в группе рано умерших — до лечения 32,8 %, после лечения — 35,4 %). О симптоматическом и побочном эффектах мы упоминали выше при характеристике кооперированных материалов 2 институтов.

ИССЛЕДОВАНИЕ 2

2-е исследование, проведенное нами на больных НМРЛ, было осуществлено в преддверии совместного

Таблица 4
Динамика иммунологических параметров до и после применения КЛТ

Иммунологические параметры, норма	До или после применения КЛТ	Выживаемость больных	
		> 1 года (n=5)	< 1 года (n=6)
CD3+, 23-60 %	до	60,8 %	53,9 %
	после	63,1 %	60,4 %
CD4+, 35-46 %	до	32,6 %	34,1 %
	после	48,7 %	34,0 %
CD8+, 25-30 %	до	21,1 %	25,6 %
	после	30,2 %	32,0 %
CD4+/CD8+, 1,2-2,4	до	1,69	1,22
	после	1,91	1,28
HLA-DR, 7-15 %	до	6,1 %	7,2 %
	после	14,5 %	11,4 %
CD50+, 85-100 %	до	89,6 %	91,5 %
	после	98,4 %	94,5 %
CD16+, 10-20 %	до	16,1 %	20,5 %
	после	27,1 %	18,3 %
CD25+, 0-5 %	до	1,5 %	4,9 %
	после	4,1 %	4,7 %
CD5+, 60-80 %	до	68,0 %	61,0 %
	после	76,2 %	68,9 %
CD38+, 28-40 %	до	23,7 %	39,3 %
	после	38,1 %	42,3 %
CD7+, 60-80 %	до	71,1 %	67,2 %
	после	78,2 %	69,7 %
CD45RA, 45-65 %	до	55,1 %	47,0 %
	после	58,1 %	44,6 %
CD20+, 5-15 %	до	7,9 %	5,8 %
	после	17,9 %	6,1 %
CD95+, 23-60 %	до	39,2 %	32,8 %
	после	53,9 %	35,4 %
CD11b+, 10-35 %	до	29,9 %	24,9 %
	после	32,0 %	20,6 %
CD71+, 0-5 %	до	6,9 %	6,2 %
	после	6,0 %	4 %
IgG, 12,8 г/л	до	23,0	22,8
	после	24,9	31,5
IgA, 2,05 г/л	до	4,8	4,5
	после	3,9	6,1
IgM, 1,33 г/л	до	0,83	1,27
	после	1,01	1,5

российско-китайского рандомизированного сравнения одновременного применения КЛТ и химиотерапии гемцитабином и цисплатином и только химиотерапии этими препаратами (без КЛТ).

Мы апробировали режим одновременного назначения КЛТ, гемцитабина и цисплатина на 7 больных. Дизайн исследования представлен на рис. 2.

Нелеченные больные с метастатическим НМРЛ получали в/в КЛТ по 300 мл (инфузия 2,5 ч), 4 3-нед цикла по 5 дней в нед. Одновременно применялся ре-

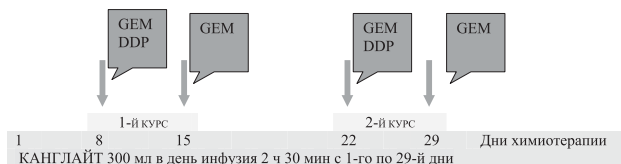


Рис. 2. Дизайн исследования одновременного применения КЛТ и химиотерапии

Таблица 5
Характеристика больных НМРЛ, исследование 2

Количество больных	7
Оценено	6
Средний возраст	60,7
Плоскоклеточный рак	3
Аденокарцинома	2
Недифференцированный рак	1
Стадия IV	6
Первичная опухоль	6
Метастазы в лимфатические узлы	6
Отдаленные метастазы	6
Опухолевый плеврит	4

жим химиотерапии: цисплатин 75 мг/м² д. 8 + гемцитабин 1250 мг/м² 8-й и 15-й дни каждые 3 нед.

Характеристика больных видна из табл. 5. Оценка эффекта производилась по динамике суммы наибольших измеряемых диаметров опухолевых образований (система re cist), более 30 % уменьшения размеров по данной системе означает частичный эффект. Результаты лечения представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6
Сумма наибольших опухолевых диаметров до и после лечения

Инициалы	До лечения, мм	После лечения, мм	Оценка эффекта, %, PR
ААР	86	58	32,6
ИАЗ	54	28	48,2
ЮАХ	32	10	68,7
НАС	48	30	37,5
ВВШ	114	77	32,5
НИШ	73	48	34,3

Симптоматический эффект характеризовался следующими показателями:

- уменьшение кашля — у 5/6;
- ослабление одышки — у 3/4;
- прекращение кровохаркания — у 1/1;
- ослабление болей — у 1/2;
- ЕСОГ после лечения 1 у всех больных.

Таблица 7

Исследование одновременного применения КЛТ + гемцитабина + цисплатина у больных НМРЛ

№	Инициалы больных	Время до прогрессирования, мес	Продолжительность жизни в днях
1	НИШ	4	727
2	НАС	8	690
3	ЮАХ	9	485
4	ВВШ	7	599
5	ИАЗ	8	742
6	ААР	5,5	180
7	ИЭА	Не оценена	

Более 1 года выжили 5 из 6 больных (83,3 %), в том числе 2 из 6 более 1,5 лет (33,3 %) и 2 из 6 более 2 лет (33,3 %). Медиана выживаемости этой группы больных составила 640 дней — 21,3 мес.

Осложнений от введения КЛТ ни у одного из больных не наблюдалось. Токсичность химиотерапии охарактеризована в табл. 8.

Таблица 8

Осложнения от применения гемцитабина и цисплатина

Нейтропения	IV ст. — 2, III ст. - 2
Фебрильная нейтропения	1
Лейкопения	III ст. — 1
Анемия	II ст. — 3
Тромбоцитопения	IV ст. -3, II ст. - 2
Тошнота и рвота	I ст. - 6
Инфекция	III ст. - 1
Повышение креатинина	I ст. - 1
Боли	II ст. - 2

Только у одной больной тяжелая тромбоцитопения и фебрильная нейтропения были причиной прекращения терапии. У остальных больных осложнения носили преходящий характер и к очередному курсу химиотерапии прекращались.

Отмечена стимуляция следующих иммунологических параметров после лечения КЛТ + GEM + DDP: CD3, CD20, HLA-DR, CD50, CD45RA, CD5, CD7, CD95, CD4/CD8.

Российско-китайское рандомизированное исследование начато в 3 учреждениях России — ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, институте онкологии им. П. И. Герцена, больнице № 62. Результаты еще не подытожены.

Таким образом, применение КЛТ при НМРЛ в последовательной комбинации с эпопозидом и цисплатином или одновременное применение КЛТ с гемцитабином и цисплатином увеличивает общую выживаемость больных. Из 17 пациентов 2 (11,7 %) прожили 3 года, 3 (17,6 %) — 2 года, 4 (23,5 %) — от 1 года до 1,5 лет, лишь 7 (41,1 %) больных — менее 1 года. Таким образом, более 1 года прожили 58,9 %. Медиана выживаемости всей группы составила 485 дней — 16,1 мес. График выживаемости представлен на рис. 3.

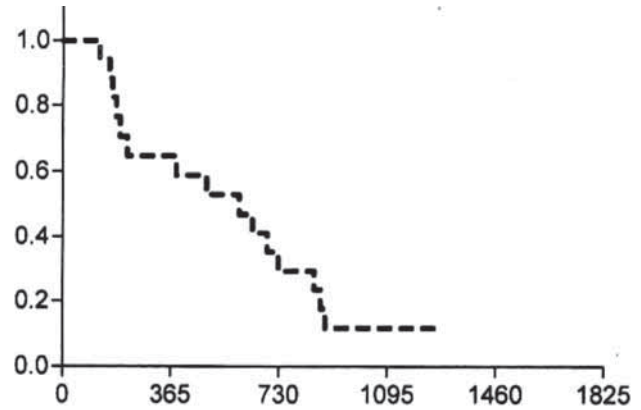


Рис. 3. Общая выживаемость больных НМРЛ при лечении КЛТ + химиотерапией

По современным представлениям, эффективность лечения распространенного НМРЛ дуплетами DDP+Tax, DDP+Txt, DDP+Vp-16, DDP+GEM, CBDCA+Tax одинакова. Медиана выживаемости варьирует от 8 до 10 мес, более 1 года живут 30 % больных (Natabe 2004).

По нашим данным, соотношение медианы выживаемости в группах со стандартной химиотерапией к медиане выживаемости в группе с применением КЛТ составляет 0,62 %. Это означает, что средняя выживаемость после лечения по программе КЛТ + химиотерапия на 38 % лучше, чем после одной химиотерапии.

ПРИМЕНЕНИЕ КЛТ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

По данным китайских исследователей, проводивших испытание КЛТ в Anhui Tumor Hospital, уменьшение метастазов РЖ на 25 % зарегистрировано у 8 (15,1 %) из 53 больных.

Клиническое улучшение, характеризующее улучшение качества жизни, отмечено у 90 %, статус по Карновскому улучшился на 20 % у 90 % больных, ослабление болей зафиксировано у 60,4 %. По данным Li Dareng (2002), эффект КЛТ при РЖ в режиме монотерапии не превышает 20 %.

Эффект комбинации ELF по международным данным составляет 30 %, медиана выживаемости — 7 мес. В Китае продемонстрировано синергическое действие КЛТ и комбинации ELF.

После соответствующего разрешения департамента государственного контроля лекарственных средств и медицинской техники МЗ РФ было организовано изучение комбинации КЛТ и химиотерапии по схеме ELF (эпопозид + лейковорин + фторурацил) в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, онкологическом клиническом диспансере №1 г. Москвы (профессор В. И. Борисов и др.), НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова (проф. М. Л. Гершанович и др.).

В этой статье мы подробно приведем собственные данные и кратко представим сведения, полученные в других учреждениях.

КЛТ в дозе 200 мл инфузирова­лся ежедневно с 1-го по 21-й дни, в течение 2 ч. Этопозид 120 мг/м² вво­дился внутривенно с 19-го по 21-й день, в эти же дни в/в вводились фторурацил 500 мг/м² и лейковорин 20 мг/м². После интервала в 7 дней осуществлялся 2-й курс. В дальнейшем больные продолжали химиотера­пию ± КЛТ (в зависимости от эффекта).

Оценивался объективный эффект по сумме наи­больших диаметров измеряемых опухолей, регистри­ровалась также стабилизация, время до прогресси­рования, продолжительность жизни больных. Дизайн ис­следования представлен на рис. 4.

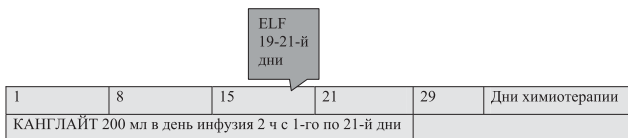


Рис. 4. Дизайн исследования применения КЛТ и химиотерапии (этопозид, фторурацил, лейковорин)

Характеристика больных представлена в табл. 9 и 10.

Измеряемые проявления локализовались в лимфо­узлах у 17 (80,9 %) больных из 21, в печени — у 8 (38,1 %) из 21, в желудке — у 3 (14,3 %) из 21.

Неизмеряемые опухоли отмечены как рецидивные или первичные в желудке у 15 (71,4 %) больных из 21, как диссеминация по брюшине — у 13 (61,9 %) из 21, мелкие метастазы в печени — у 5 (23,8 %), метастазы

Таблица 9

Характеристика больных РЖ, включенных в исследование КЛТ + химиотерапия по схеме TLF

Число больных	21
Средний возраст	57,6 лет
Ранее не получали химиотерапии:	
Мужчины	18
Женщины	3
Аденокарцинома	21
Статус по Карновскому:	
80–90 %	11
70–60 %	10
Вес: > 60 кг	15
< 60 кг	6

Таблица 10

Проявления РЖ

Первичная опухоль	16
Метастазы в регионарных лимфоузлах	14
Отдаленные метастазы	18
Асцит	3
Жалобы на слабость 15/24	71,4 %
Желудочный дискомфорт 15/21	71,4 %
Дисфагия 4/21	19 %
Боли 12/21	57,1 %

в лимфоузлы у 4 (19 %) больных. Асцит зарегистриро­ван у 3 (14,2 %) пациентов.

Эффективность лечения оценивалась у 18 боль­ных, токсичность — у 19. Эти пациенты получили по 2 3-недельных цикла терапии КЛТ (38 циклов) и 2 цикла терапии по программе ELF. Леченные с эффек­том или стабилизацией продолжали терапию по схеме ELF. После прогрессирования процесса больные пере-

Таблица 11

Результаты лечения РЖ

Всего больных	21
Оценено	18
Частичный эффект*	8 (44,5), время до прогрессирования 188 дней
Стабилизация*	6 (33,3), время до прогрессирования 155 дней
Прогрессирование*	4 (22,2), время до прогрессирования 68 дней
* В скобках — %.	

водились на терапию кселодой или митомидином (комбинация MVP) или фторурацилом.

Сводные данные о результатах лечения представ­лены в табл. 11.

Более года прожили 7 (38,8 %) больных, 4 (22,2 %) из них выжили 2 года, 1 больной жив, 3 (16,6 %) боль­ных жили от 1 до 1,5 лет. Медиана выживаемости со­ставила 8,9 мес. Клиническое улучшение, включаю­щее стабилизацию и эффект, отмечено в 77,8 %. Обра­щает на себя внимание, что среди выживших более 2 лет — 1 больной с оценкой «частичный эффект», 2 — со стабилизацией и 1 — с оценкой «прогрессирова­ние». Среди выживших от 1 до 1,5 лет 2 с оценкой «ча­стичный эффект» и 1 с оценкой «прогрессирование».

Симптоматический эффект зарегистрирован у 7 из 8 леченных с частичной регрессией, у 4 из 5 больных с оценкой «стабилизация» и у 1 из 5 с прогрессирова­нием заболевания. Всего симптоматический эффект отмечен у 12 (66,7 %) из 18 больных.

Побочных эффектов от инъекций КЛТ не зафикси­ровано. При проведении 38 циклов ELF на фоне тера­пии КЛТ осложнения зарегистрированы со следую­щей частотой:

Нейтропения III и IV степеней зафиксирована после 17 (44,7 %) из 38 циклов терапии. У всех больных ней­тропения была обратимой. Лейкопения III и IV степеней зарегистрирована в 8 (21 %) из 38 циклов терапии.

Тромбоцитопения была слабо выраженной (I и II степеней) после 9 (23,6 %) циклов.

Анемия — у 7 (36,8 %) из 19 больных, у 6 — II сте­пени, у 1 — IV степени.

Тошнота и рвота (I и II степени) наблюдались после 9 (44,7 %) из 38 циклов. Стomatит (I-II степени) от­мечен после 5 (13,6 %) циклов, диарея (I степени) — после 4 (10,5 %) циклов, гипоальбуминемия (I степе­ни) — у 6 (31,5 %) из 19 больных, гипопро­теинемия у 4 (21,6 %) из 19 пациентов, гипертермия (I и II степе­ни) после 2 (5,2 %) циклов, алопеция у 8 (44,5 %) из 18 пациентов (I, II степени), астения у 2 (10,5 %) из 19 больных.

При оценке иммунологического статуса 7 больных, проживших от 1 до 2 лет после начала терапии КЛТ, иммунологические параметры характеризуются следующим образом: CD3⁺ до лечения 56,8 %, после — 60,8 %, CD4⁺ 34 % и 43,7 %, CD8⁺ 28,4 % и 24,5 %, CD5⁺ 58,6 % и 65,9 %, CD4/CD8 — 1,25 и 3,13; такие показатели, как CD20⁺, HLA-DR⁺, CD38⁺, CD50⁺, CD7⁺, CD95⁺, были у этих больных в норме и оставались в норме после лечения.

Из отчета онкологического клинического диспансера №1 Департамента здравоохранения г. Москвы следует, что из 12 больных РЖ, включенных в аналогичный протокол исследования, оценены по эффекту 10, частичная ремиссия зафиксирована в 1 (10 %) случае, стабилизация в 6 (60 %), прогрессирование в 3 (30 %) случаях. Больной с частичной ремиссией прожил 374 дня, больные со стабилизацией — 307 дней, с прогрессированием — 272 дня. Медиана выживаемости по нашим расчетам составила 9,6 мес. 20 % больных прожили более года.

В НИИ онкологии им. Н. П. Петрова (профессор М. Л. Гершанович) из 9 оцененных больных у 1 — частичный эффект, у 3 — стабилизация, время до прогрессирования процесса — 145 дней. 3 из 9 больных живы более года. Медиана выживаемости по нашим расчетам составила 8,4 мес.

Медиана выживаемости всех больных в 3 учреждениях составила 9,3 мес.

Так же, как и при раке легкого, мы отметили, что 7 из 18 больных РЖ жили более года (38 %), в том числе 4 пациента — 2 года (22,2 %), что необычно для режима ELF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании своего опыта мы подтверждаем случаи необычного долгожительства после комбинированного применения КЛТ и химиотерапии при лечении диссеминированного НМРЛ и РЖ. Они отмечены соответственно в 10 из 17 и 7 из 18 случаев. Медиана выживаемости демонстративно выше у больных НМРЛ при применении комбинации КЛТ + ЕР или КЛТ + GP — 16,1 мес и несколько выше стандартных результатов от ELF при РЖ (7 мес, в наших исследованиях — 9,3 мес). Несомненно иммуномодулирующий эффект КЛТ. Иммунологический статус больных, проживших более 1 года, выгодно отличается от статуса

умерших раньше этого срока по таким параметрам, как CD4⁺, CD4/CD8, HLA-DR⁺, CD50⁺, CD95⁺, CD16⁺, CD25⁺, CD20⁺, CD45RA⁺.

ЛИТЕРАТУРА

1. Возный Э. К., Кононенко И. Б., Бычков Ю. М. Опыт применения Канглайта у больных с немелкоклеточным раком легкого // Материалы Всекитайской научно-практической противоопухолевой конференции. — Ханчжоу, 2002.

2. Гарин А. М., Тюляндин С. А., Базин И. С. и др. Клиническое исследование препарата Канглайт при немелкоклеточном раке легкого в России // Материалы Всекитайской научно-практической противоопухолевой конференции. — Ханчжоу, 2002.

3. Кадагидзе З. Г., Короткова О. В. Динамика иммунологического статуса у больных раком легкого, леченных Канглайтом в инъекциях // Материалы Всекитайской научно-практической противоопухолевой конференции. — Ханчжоу, 2002.

4. *Chy Datong et al.* Collection of the studies of Kanglaite injection against tumors // Zhejiang Univ. Press., 2002. — P. 192–197.

5. *Jiang Xialing et al.* Effect of Kanglaite injection on angiogenesis // Материалы Всекитайской научно-практической противоопухолевой конференции. — Ханчжоу, 2002.

6. *Li Dapeng* Progress in Basis studies and clinical Application of Kanglaite injection // Материалы Всекитайской научно-практической противоопухолевой конференции. — Ханчжоу, 2002

7. *Piao Bingkui et al.* Collection of the studies of Kanglaite injection against tumors // Zhejiang Univ. Press., 1998. — P.152–168.

8. *Wang Junjei et al.* Apoptosis induced by KLT injection and its relation with expression of p53, Bcl2 in renal cancer cell lines // Материалы Всекитайской научно-практической противоопухолевой конференции. — Ханчжоу, 2002

9. *Zheng Shi-Ying et al.* In vivo study on inducing apoptosis and reducing cell proliferation by Kanglaite in mice with CGC7901 Gastric Cancer // Материалы Всекитайской научно-практической противоопухолевой конференции. — Ханчжоу, 2002.

Поступила 26.04.2006.

